

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 18 January 1999 (18.01.99)	
<b>International application No.</b> PCT/EP98/03679	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 12/191
<b>International filing date (day/month/year)</b> 18 June 1998 (18.06.98)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 20 June 1997 (20.06.97)
<b>Applicant</b> WAGNER, Ernst et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 December 1998 (16.12.98)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer N. Fischer</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL  
GMBH  
Postfach 200  
D-55216 Ingelheim am Rhein  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 18 January 1999 (18.01.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>  International filing date (day/month/year) 18 June 1998 (18.06.98)
Applicant's or agent's file reference 12/191	
International application No. PCT/EP98/03679	

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☒ the common representative

Name and Address BOEHRINGER INGELHEIM GMBH Postfach 200 D-55216 Ingelheim am Rhein Germany	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 06132 772 282	
	Facsimile No. 06132 774 377	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☒ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH Postfach 200 D-55216 Ingelheim am Rhein Germany	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 06132 772 282	
	Facsimile No. 06132 774 377	
	Teleprinter No.	

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  N. Fischer  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/87, C07K 14/485, 14/79, C12N 9/12, C07K 14/52, A61K 31/70</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/59064</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Dezember 1998 (30.12.98)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/03679 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 18. Juni 1998 (18.06.98) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 26 186.8      20. Juni 1997 (20.06.97)      DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WAGNER, Ernst [AT/AT]; Wienerstrasse 201, A-2103 Langenzersdorf (AT). OGRIS, Manfred [AT/AT]; Währinger Gürtel 71/14, A-1180 Wien (AT). KIRCHEIS, Ralf [DE/AT]; Ziedlergasse 16/3/5, A-1230 Wien (AT). BRUNNER, Sylvia [AT/AT]; Lange Gasse 67/20, A-1080 Wien (AT). <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, HU, IL, JP, KR, KZ, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, YU, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title: COMPLEXES FOR TRANSPORTING NUCLEIC ACID INTO EUKARYOTIC HIGHER-CELLS</b>		
<b>(54) Bezeichnung: KOMPLEXE FÜR DEN TRANSPORT VON NUKLEINSÄURE IN HÖHERE EUKARYOTISCHE ZELLEN</b>		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The invention relates to complexes consisting of nucleic acid and polyethylene imine (PEI) in which the PEI is modified by means of hydrophilic polymers, such as polyethylene glycol, linked to the PEI by a covalent bond, and to a method for producing said complexes. A cellular ligand such as transferrin is possibly bound to the PEI. The complexes can be used for producing pharmaceutical compounds for the transfer of therapeutically active genes in mammalian cells.</p>		
<b>(57) Zusammenfassung</b>		
<p>Komplexe aus Nukleinsäure und Polyethylenimin (PEI), in denen PEI mit einem daran kovalent gekoppelten hydrophilen Polymeren, wie Polyethylenglykol, modifiziert ist sowie Verfahren zu deren Herstellung. An PEI ist gegebenenfalls ein zellulärer Ligand wie Transferrin gekoppelt. Die Komplexe können zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen für den Transfer von therapeutisch wirksamen Genen in Säugetierzellen verwendet werden.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Komplexe für den Transport von Nukleinsäure in höhere eukaryotische Zellen

- 5 Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet des Gentransfers.

Es ist bekannt, daß die Komplexierung von DNA mit Polyethylenimin (PEI) erfolgreich eingesetzt werden kann, um Gene in die Zelle zu transportieren (Boussif et  
10 al., 1995; Boussif et al., 1996; Abdallah et al., 1996). Der Gentransfer erfolgt dabei dadurch, daß die Komplexe ungerichtet an Zellen gebunden und aufgenommen werden. Um eine Spezifität der Bindung zu erreichen, wurden verschiedene Liganden, z.B. Transferrin (Tf) oder  
15 Antikörper kovalent an PEI gekoppelt, um die Gene über den Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose in die Zelle zu transportieren (Kircheis et al., 1997). Auch bei dieser Methode bleibt jedoch ein gewisser Anteil des erzielten Gentransfers unspezifisch, was auf  
20 eine Aufnahme der Komplexe in die Zelle unabhängig vom Liganden zurückzuführen ist.

Für die effiziente Anwendung der Gentherapie *in vivo* gibt es, neben der Spezifität, weitere Voraussetzungen, die es zu erfüllen gilt. Dazu zählt für viele  
25 Anwendungen eine möglichst geringe Größe der Komplexe. Das Erfordernis möglichst kleiner Komplexe ist u.a. durch die physikalischen Gegebenheiten im Organismus bedingt, wie zum Beispiel den geringen Durchmesser vieler Blutgefäße; ein Erreichen bestimmter Gewebe ist  
30 nur durch kleine, nicht aggregierende Komplexe möglich. Soll die Aufnahme der Komplexe durch rezeptorvermittelte Endozytose erfolgen, so ergibt sich eine

Größenlimitierung von max. 200 nm, um eine Aufnahme in die "coated pits" zu ermöglichen (Stryer, 1990).

Polykation/DNA-Komplexe weisen gegenüber viralen Systemen den Vorteil geringer Immunogenität und geringer Risiken auf, sind jedoch im Vergleich zu viralen Gentransfermethoden weniger effizient (Hodgson, 1995). Dieser Nachteil kann grundsätzlich durch den Einsatz größerer Mengen an zu transferierender DNA ausgeglichen werden. In Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung zeigte sich jedoch, daß durch Erhöhung der Konzentration an DNA und Polykation die Tendenz zur Aggregatbildung bei der Komplexierung zunimmt.

Ein limitierender Faktor beim Gentransfer ist ferner die unspezifische Immunabwehr im Blutstrom des Organismus durch sog. Opsonisierung, welche eine der ersten Barrieren ist, die Gentransferpartikel *in vivo* überwinden müssen. Dabei binden Plasmaproteine an eingedrungene Bakterien, Viren oder andere Fremdkörper und lösen dadurch weitere Abwehrmechanismen des Immunsystems aus (Roitt et al. 1991). Die Bedeutung der Proteinbindung an Liposomen, wie sie für den Gentransfer verwendet werden können, wurde von Chonn et al., 1992 gezeigt. Hier konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an gebundenem Protein und der Halbwertszeit der Liposomen im Blutstrom nachgewiesen werden.

Eine weitere wichtige Komponente der unspezifischen Immunabwehr ist die Aktivierung des Komplementsystems. Viele kationische Lipide und andere Polykationen, die für den Gentransfer verwendet werden, zeigen eine starke Komplementaktivierung (Chonn, et al., 1991; Plank et al., 1996). In der Natur vorkommende sogenannte Dysopsonine können ein Anheften dieser Proteine verhindern (Absolom, 1986). So können zum Beispiel

Bakterien der Opsonisierung entgehen, indem sie an ihrer Oberfläche hoch hydrophile Zuckerreste tragen.

Es wurden bereits verschiedene Methoden entwickelt, um eine Opsonisierung von Partikeln zu verhindern. Eine der  
5 am häufigsten angewandten Methoden ist die Verwendung von kovalent gekoppeltem Polyethylenglykol (PEG) (Mori et al., 1991; Chonn et al., 1992; Woodle et al., 1994). Dabei konnte sowohl eine reduzierte Proteinbindung als auch eine verlängerte Halbwertszeit der verwendeten  
10 Liposomen im Blutstrom gezeigt werden.

Die Menge des eingesetzten PEG betrug meist zwischen 2 und 10 % PEG-gekoppeltem Lipid im Liposom (m/m), das Molekulargewicht von PEG zwischen 750 und 5000 D (Klibanov et al., 1990.; Blume et al, 1990; Mayhew et  
15 al, 1992; Papahadjopoulos et al, 1991; Senior et al, 1991; Mori et al, 1991; Yoshioka, 1991). Für die sterische Stabilisierung von Partikeln wurde von Woodle et al., 1994, die Bedeutung des Molekulargewichts gezeigt. Dabei erwiesen sich PEG-Derivate ab einer Größe  
20 von 2000 D bis 5000 D geeignet; in der Arbeit von Torchilin et al., 1992 zeigten sich PEG-Derivate mit einem Molekulargewicht 5000 D als geeignet.

Klibanov et.al 1991 beschrieb die stabilisierende Wirkung von PEG 5000 D in Liposomen, die spezifische  
25 Liganden enthalten (sog. Immunoliposomen). Dabei konnte aber festgestellt werden, daß dieses PEG zu einer etwas verschlechterten Bindung des Liganden an den Rezeptor führt. In Torchilin et.al 1992, wird jedoch gezeigt, daß die verlängerte Halbwertszeit der Immunoliposomen durch  
30 PEG-coating und somit eine Verringerung der unspezifischer Aufnahme durch das RES (retikuloendotheliale System) die verschlechterte Ligand-Rezeptor Interaktion mehr als kompensiert.

Von Kirpotin et.al., 1997, wird die Anwendung  
bifunktioneller PEG's, deren Herstellung von Zalipsky  
et. al., 1997, näher dargestellt wird, für die  
nachträgliche Kopplung von Liganden an PEG-Liposomen  
5 gezeigt.

Ähnliche Ergebnisse wie mit PEG konnten für Liposomen  
mit Gangliosiden von Mori et al., 1991), und für  
Polystyren- und Goldpartikel mit Co-Polymeren aus  
Polyoxyethylen und Polyoxypropylen (Moghimi et al.,  
10 1993) erreicht werden. Um die Aktivierung des  
Komplementsystems zu verringern, wurden  
DNA/Polylysinkomplexe ebenfalls mit PEG modifiziert  
(Plank et al., 1996). Eine Erhöhung der Spezifität  
sogenannter Immunoliposome konnte von Torchilin et al.,  
15 1992, gezeigt werden. Dabei zeigten Liposomen, die  
sowohl Antikörper für ein bestimmtes Gewebe als auch PEG  
enthalten, eine deutlich bessere Spezifität als  
Liposomen ohne PEG.

Versuche von Torchilin et al., 1994, ergaben, daß  
20 amphiphile Vinylpolymere die Halbwertszeit von Liposomen  
in vivo deutlich verlängern können. Torchilin und  
Papisov, 1994, zeigten, daß für den Schutzeffekt von PEG  
und die dadurch bewirkte längere Halbwertszeit von  
Liposomen die Beweglichkeit der Polymerkette  
25 verantwortlich sein dürfte.

Die bisherigen Versuche zur Verringerung der Interaktion  
von DNA/Polykationkomplexen mit dem Komplementsystem  
beschränkten sich auf Polylysin enthaltende Komplexe  
(Plank et al., 1996). Dabei wurde der Effekt beobachtet,  
30 daß durch das Koppeln von PEG an positiv geladene  
DNA/Polylysin Komplexe eine Verringerung der  
Komplementaktivierung erreicht werden kann.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein  
alternatives Gentransfersystem bereitzustellen, das

effizient und sehr spezifisch sowie für *in vivo* Anwendungen geeignet ist.

Die Lösung dieser Aufgabe besteht in Komplexen aus Nukleinsäure und Polyethylenimin, die dadurch  
5 gekennzeichnet sind, daß das Polyethylenimin mit einem daran kovalent gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist.

Im folgenden werden die erfindungsgemäßen Komplexe der Einfachheit halber als DNA/PEI/Polymer-Komplexe  
10 bezeichnet.

Das Verhältnis von DNA zu PEI wird im folgenden durch die Angabe des molaren Verhältnisses der Stickstoffatome im PEI zu den Phosphataten in der DNA angegeben (N/P-Wert); ein N/P-Wert von 6.0 entspricht einer  
15 Mischung von 10 µg DNA mit 7,5 µg PEI. Im Falle von freiem PEI ist unter physiologischen Bedingungen nur etwa jedes sechste Stickstoffatom protoniert. Ergebnisse mit DNA/PEI Komplexen zeigen, daß diese bei einem N/P-Verhältnis von 2 bis 3 annähernd elektroneutral sind.

20 Der N/P-Wert der Komplexe kann über einen breiten Bereich schwanken, er kann im Bereich von etwa 0.5 bis etwa 100 gelegen sein. Bevorzugt beträgt das Verhältnis etwa 2 bis etwa 20, besonders bevorzugt beträgt das Verhältnis 3 bis 10.

25 Im einzelnen kann der N/P-Wert für den speziellen Anwendungsfall, z.B. für den zu transfizierenden Zelltyp, durch Vorversuche ermittelt werden, indem unter ansonsten identischen Bedingungen das Verhältnis erhöht wird, um das im Hinblick auf die Transfektionseffizienz  
30 optimale Verhältnis festzustellen und einen für die Zellen toxischen Effekt auszuschließen.

Das in den Komplexen enthaltene PEI weist ein Molekulargewicht von ca. 700 D bis ca 2000000 D auf. Größere PEI-Moleküle ergeben nach Komplexierung mit DNA bereits bei niedrigeren N/P Verhältnissen ein Optimum  
5 der Transfektionseffizienz, sie resultieren im allgemeinen in einer sehr guten Transfektionseffizienz. Kleinere Moleküle, von denen pro vorgegebener DNA-Menge eine größere Menge zur Komplexierung erforderlich ist, haben, bei geringerer Effizienz, den Vorteil einer  
10 geringeren Toxizität. Welches PEI-Molekül im einzelnen verwendet wird, kann in Vorversuchen ermittelt werden.

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind PEI-Moleküle im Molekulargewichtsbereich zwischen 2000 und 800000.

15 Beispiele für kommerziell erhältliches PEI mit unterschiedlichen Molekulargewichten, das im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, sind PEI 700 D, PEI 2000 D, PEI 25000 D, PEI 750000 D (Aldrich), PEI 50000 D (Sigma), PEI 800000 D (Fluka). Von BASF wird  
20 PEI unter dem Markennamen Lupasol® ebenfalls in verschiedenen Molekulargewichten angeboten (Lupasol® FG: 800 D; Lupasol® G 20 wasserfrei: 1300 D; Lupasol® WF: 25000 D; Lupasol® G 20: 1300 D; Lupasol® G 35: 2000 D; Lupasol® P: 750000 D; Lupasol® PS: 750000 D; Lupasol®  
25 SK: 2000000 D).

Das hydrophile, an PEI gebundene Polymere ist vorzugsweise linear bzw. in einem nur geringen Ausmaß verzweigt, so daß seine Beweglichkeit weitgehend erhalten bleibt. (Ohne auf diese Theorie festgelegt sein  
30 zu wollen, dürfte die positive Wirkung des Polymeren, neben seiner Hydrophilie, auf seine Beweglichkeit zurückzuführen sein.)

Beispiele für hydrophile, an PEI gekoppelte Polymere, sind ausgewählt aus der Gruppe Polyethylenglykole (PEG),

Polyvinylpyrrolidone, Polyacrylamide, Polyvinylalkohole, oder Copolymere dieser Polymere.

Bevorzugt als hydrophiles Polymer ist PEG.

Das Molekulargewicht des hydrophilen Polymeren beträgt  
5 im allgemeinen etwa 500 bis etwa 20000 D, vorzugsweise  
werden Moleküle mit einem Molekulargewicht von 1000 bis  
10000 D eingesetzt.

Die Menge an Polymer für die Kopplung an PEI wurde  
anhand von PEG in Vorversuchen zur vorliegenden  
10 Erfindung aus der Analyse der Anzahl primärer Amine im  
PEI-Molekül mittels Ninhydrin-Assay (Sarin et al, 1981)  
bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, daß ca.  
jedes zehnte Stickstoffatom in Form eines primären  
Amines vorliegt. Daher wurde als Ausgangspunkt ein  
15 Gewichtsverhältnis von PEG-5000 D-Derivat zu PEI von 9.2  
gewählt. Dieses entspricht größenordnungsmäßig einem  
molaren Verhältnis PEG: primäre Aminogruppen/PEI-Molekül  
von 1:1.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten  
20 Experimente sowie Begleitversuche zeigten, daß ein  
molares Verhältnis Polymer: primäre Aminogruppen/PEI in  
einem Bereich von 1:10 bis 10:1 für die sterische  
Stabilisierung von DNA/PEI Komplexen, je nach  
Anwendungsfall, geeignet ist. Bevorzugt beträgt der  
25 Bereich 1:5 bis 5:1, besonders bevorzugt 1:3 bis 3:1.

PEI ist gegebenenfalls mit einem zellulären Liganden  
modifiziert, um die spezifische Aufnahme der Komplexe  
durch Bindung an Zelloberflächenproteine, insbesondere  
Rezeptoren, zu bewirken. Beispiele für Liganden sind in  
30 der WO 93/07283 angeführt, bevorzugt wird als Ligand  
Transferrin oder EGF verwendet.

Das für einen bestimmten Transfektionsansatz jeweils am besten geeignete Polymermolekül kann, nach Typ, Molekulargewicht und Menge, in Vorversuchen ermittelt werden, ebenso die Zweckmäßigkeit der Modifikation von  
5 PEI mit einem zellulären Liganden. Bei derartigen Vorversuchen wird von einem vorgegebenen DNA/PEI Komplex ausgegangen und das Polymere hinsichtlich Art und Menge variiert, dann wird die Stabilität der Komplexe unter den gewählten Transfektionsbedingungen verglichen. Im  
10 Hinblick auf die Notwendigkeit bzw. Auswahl eines Liganden werden Komplexe, die bis auf das Vorhandensein oder Fehlen eines zellulären Liganden identisch sind, hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz miteinander verglichen.

15 Der Ligand wird an PEI mittels herkömmlicher Methoden gekoppelt, z.B. auf chemischem Weg, wie in der WO 93/07283 für die Kopplung von Virus, Virusproteinen oder -peptiden mit Polyaminverbindungen beschrieben.

In einer Ausführungsform der Erfindung ist PEI mit dem  
20 Liganden über das hydrophile Polymere verbunden. Diese Ausführungsform weist den Vorteil auf, daß hinsichtlich der Polymergröße geringere Einschränkungen auftreten, weil die Zugänglichkeit des Liganden, der sich in dieser Anordnung außerhalb der Polymerschicht befindet, und  
25 dessen Bindung an den Rezeptor nicht durch das Polymere blockiert wird.

Die in den erfindungsgemäßen Komplexen enthaltene Nukleinsäure wird vor allem durch den in der Zelle zu erzielenden biologischen Effekt definiert, im Falle der  
30 Anwendung im Rahmen der Gentherapie durch das zur Expression zu bringende Gen bzw. den Genabschnitt, z.B. zwecks Substitution eines defekten Gens, oder durch die Zielsequenz eines zu inhibierenden Gens. Bei den in die Zelle zu transportierenden Nukleinsäuren kann es sich um

DNAs oder RNAs handeln, wobei hinsichtlich der Nukleotidsequenz keine Beschränkungen bestehen.

Die erfindungsgemäßen Komplexe haben den Vorteil, daß sie in geringer Größe herstellbar sind, wobei dieser  
5 Effekt durch einen gegebenenfalls an PEI gekoppelten Liganden nicht beeinträchtigt wird.

Die Modifikation mit PEG kann auch an größeren Komplexen durchgeführt werden, ohne dabei ihre Funktionalität zu beeinträchtigen.

10 Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Herstellung der DNA/PEI-Polymer-Komplexe.

Die Herstellung von DNA/PEI/Polymer-Komplexen kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen.

Bevorzugt werden zuerst DNA und PEI durch Mischen der  
15 Lösungen komplexiert und anschließend, z.B. nach einer Reifungszeit von etwa 20-40 Minuten, kann die Reaktion mit dem Polymeren (im Fall der Reaktion mit PEG die "PEGylierung") erfolgen, wie sie in den Beispielen der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurde. Im Zuge der  
20 vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß Komplexierung bei hohen Konzentrationen der Komplexpartner einen deutlich höheren Anteil an aggregierten Komplexen liefert (siehe Beispiel 3c). Es wurde festgestellt, daß diese in vielen Fällen  
25 unerwünschte Aggregation durch Mischen der Komplexe aus sehr verdünnten Lösungen weitgehend hintangehalten werden kann. Die Verringerung der Salzkonzentration unter den physiologischen Wert verringert den Effekt der Aggregatbildung (Beispiel 1). Die Verwendung von  
30 entionisiertem Wasser anstatt physiologischer Salzkonzentration kann die Aggregation verhindern (Beispiel 1). Es hat sich gezeigt, daß physiologische Glukosekonzentrationen keinen Einfluß auf die

Aggregatbildung haben (s. Fig. 1). Es zeigte sich, daß eine Erhöhung der Salzkonzentration auf einen Wert im physiologischen Bereich im Anschluß an die Komplexierung sich nicht negativ auf die Stabilität der Komplexe auswirkt, während Komplexe ohne PEG rasch Aggregate bildeten (Fig. 2a). Es zeigte sich ferner, daß die PEGylierung der Komplexe auch zu einer verringerten Oberflächenladung der Komplexe führt (Fig.14).

In einer alternativen, bevorzugten Methode wird daher die Komplexierung bei niedrigen Konzentrationen der Komplexpartner, vorzugsweise bei ca. 5 bis 50 µg DNA/ml, insbesondere 10 bis 40 µg DNA/ml, durchgeführt. Die PEI-Konzentration wird, entsprechend dem jeweiligen N/P-Wert, auf die DNA-Konzentration abgestimmt; sie beträgt z.B. 1,25 µg/ml PEI 800000 D bei einem N/P-Wert von 2 und einer DNA-Konzentration von 5 µg/ml; bei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entsprechend 12,5 µg/ml PEI 800000 D. Die Komplexierung wird außerdem bei möglichst niedriger Ionenkonzentration durchgeführt, um ein Auftreten von Aggregaten bereits bei der Komplexierung oder unmittelbar anschließend daran zu verhindern. Gegebenenfalls wird, im Hinblick auf die weitere direkte Verwendung der Komplexe *in vivo*, die Komplexierung in Gegenwart physiologischer Zuckerkonzentration (Dextrose, Glukose, Saccharose) durchgeführt.

Die Verhinderung der Aggregation der Komplexe ist vermutlich durch die Ausbildung einer dickeren Hydratationshülle bewirkt, die das Zusammenklumpen der Komplexe verhindert.

In einer alternativen Methode werden Komplexe aus verdünnten Lösungen erhalten, wobei PEI eingesetzt wird, das bereits mit dem Polymeren, z.B. PEG, kovalent gekoppelt ist (Beispiel 2b). Auch hier zeigte sich der

stabilisierende Effekt von PEG, welches das Aggregieren der Komplexe auch nach Salzzugabe verhindert.

Die kovalente Kopplung des Polymeren an PEI kann mittels herkömmlicher Methoden durchgeführt werden, wobei

- 5 Polymer-Derivate verwendet werden, die an die freien Aminogruppen von PEI binden können. Unterschiedliche Derivate sind kommerziell erhältlich, z.B. die entsprechenden PEG-Derivate (Shearwater Polymers, USA):

- N-Hydroxysuccinimidylaktivester (Abuchowski et al, 1984; 10 Klibanov et al, 1990 zeigten die Verwendbarkeit der entsprechenden PEG-Derivate für die Modifizierung von Liposomen); Beispiele für kommerziell erhältliche PEG-Derivate dieses Typs sind Methoxy-SS-PEG, MW 5000 D; Methoxy-SSA-PEG, MW 5000 D; Succinimidylsuccinat- 15 Propionsäure-Derivate (Methoxy-SPA-5000, MW 5000 D; Methoxy-SPA-20000, MW 20000 D; Methoxy-SSPA-PEG, MW 5000); Oxycarbonylimidazol-Derivate, die unter Urethanbildung reagieren (die Bindung von PEG-Derivaten dieses Typs an Proteine wurde von Beauchamp et al, 1983, 20 gezeigt, die Verwendung zur PEGylierung von Liposomen von Allen et al, 1991; Beispiele für Handelsprodukte sind Methoxy-PEG-CDI, MW 5000 D); Glycidylether (Pita et al, 1970; Elling et al, 1991); Tresylate (die Bindung von PEG-Tresylaten an Proteine und Liposomen wurde 25 beschrieben von Nilsson et al, 1984; Yoshinaga et al, 1989; Delgado et al, 1990; Dust et al, 1990; Senior et al., 1991; Klibanov et al, 1991; Beispiele für kommerziell erhältliche PEG-Tresylate sind Methoxy-PEG-Tres, MW 5000; Methoxy-PEG-Tres, MW 200); Aldehyde, 30 deren Bindung mit Natriumcyanborhydrid an Aminogruppen erfolgt (Wirth et al, 1991; Handelsprodukte sind Methoxy-PEG-ald, MW 5000; M-ALD-PEG-200: Methoxy-PEG-ald, MW 2000).

Im Falle der Gegenwart eines zellulären Liganden in den Komplexen wird bei der Herstellung wie folgt vorgegangen:

5 In einer Ausführungsform wird das PEI an den Liganden gekoppelt, wie in der EP-A1 388 758 bzw. von Kircheis et al., 1997, beschrieben, im Anschluß daran wird die Komplexierung mit den übrigen Reaktionspartnern vorgenommen, wie oben beschrieben.

10 Um Komplexe herzustellen, in denen die Bindung des Liganden an PEI über das Polymere erfolgt, werden bifunktionelle Polymere verwendet, die an beiden Molekülenden unterschiedliche reaktive Gruppen aufweisen. Dazu können Polymere, z.B. PEG, verwendet werden, wie sie bisher für die Kreuzvernetzung  
15 unterschiedlicher Makromoleküle verwendet wurden, z.B. für die Vernetzung von Cofaktor und Apoenzym (Nakamura et al, 1986), Zielsteuerung polymerer Wirkstoffe (Zalipsky und Barany, 1990) oder PEG-Beschichtung von Oberflächen und Proteinen (Harris et al, 1989). Die im  
20 Rahmen der vorliegenden Erfindung u.a. verwendbaren bifunktionellen Derivate sind kommerziell erhältlich, sie enthalten Aminogruppen, Hydroxygruppen oder Carbonsäuregruppen an den Molekülenden, z.B. wie von Shearwater Polymers erhältliche Produkte. Ebenfalls  
25 verwendbare Derivate sind NHS-Maleinimid- und NHS-Vinylsulfonderivate, die ihre Reaktionsoptima bei unterschiedlichen pH-Werten haben. Auch Biotin-PEG-Maleinimid oder -NHS Derivate können verwendet werden, wobei an die MAL bzw. NHS Gruppe eine kovalente Kopplung  
30 erfolgen kann und die biotinylierte Seite mit Streptavidin enthaltenden Molekülen oder Partikel reagieren kann.

Bei Verwendung bifunktioneller Polymere ergeben sich für die Bildung von DNA/PEI/Ligand/Polymer-Komplexen mehrere

Möglichkeiten: Dabei kann die Kopplung von bifunktionellem Polymer, z.B. PEG, an PEI erfolgen und ein Ligand mit passender funktioneller Gruppe an die zweite, freigebliebene funktionelle Gruppe am Polymer, wahlweise vor oder nach Komplexierung mit DNA, gekoppelt werden. Die Bindung PEG-PEI kann über die primären Amine des PEI erfolgen, wobei jedoch auch die vorhergehende Kopplung anderer reaktiver Gruppen, wie SH-Gruppen, an PEI möglich ist, die als Reaktionspartner für PEG-Derivate fungieren können. Auch ist die vorhergehende Kopplung von Liganden an bifunktionelles PEG möglich, wobei die weitere Bindung an PEI vor oder nach Komplexierung mit DNA möglich ist. In all diesen Fällen ergeben sich dabei, besonders bei der Verwendung kleiner Liganden, Vorteile, die bei einer eventuellen nachträglichen PEGylierung durch das PEG abgeschirmt werden können.

Durch die Verwendung bifunktioneller PEG Derivate funktioniert das lineare, hydrophile Polymer-Molekül gewissermaßen als Abstandhalter zwischen PEI und Ligand.

Für bestimmte *in vivo* Anwendungen ist es im Hinblick auf eine hohe Gentransfereffizienz erforderlich, daß die erfindungsgemäßen Komplexe in hoher Konzentration, zweckmäßig in einer Konzentration von mindestens ca. 200 µg DNA/ml, vorliegen. Die Komplexkonzentration kann, bei höherem Gehalt an hydrophilem Polymer, bis zu ca. 1 mg/ml betragen.

Die erfindungsgemäßen Komplexe weisen überrascherweise den Vorteil auf, daß sie aus verdünnten Lösungen auf die erforderliche hohe Konzentration gebracht werden können, ohne daß eine nennenswerte Aggregatbildung, die die Gentransfereffizienz beeinträchtigen würde, auftritt. Es konnte auch gezeigt werden, daß die Modifikation der Komplexe mit PEG zu einer erhöhten Beständigkeit der

Komplexe im Blut von Mäusen führt. Dieser Effekt trägt auch dazu bei, daß nach z.B. intravenöser Applikation der Komplexe ein Gentransfer im subkutanen Tumor erzielt wird.

- 5 Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt eine Zusammensetzung für die Transfektion höherer eukaryotischer Zellen, die DNA/PEI/PEG Komplexe in einer Konzentration, bezogen auf DNA, von etwa 200 µg/ml bis etwa 1 mg/ml enthält.
- 10 Insbesondere liegt die Zusammensetzung in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung vor. In dieser Ausgestaltung dient die Zusammensetzung zur Transfektion von Säugetierzellen *in vivo*; sie enthält als aktiven Bestandteil einen Komplex, der eine therapeutisch
- 15 wirksame Nukleinsäure enthält. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann, bei lokaler Anwendung, eine hohe Konzentration an therapeutisch wirksamer DNA im Gewebe erzielt werden. Bei der systemischen Anwendung hat die Zusammensetzung
- 20 den Vorteil, daß die Komplexe wegen der Verhinderung der Opsonierung weder unspezifischer Bindung noch Abbau unterliegen.

- Durch Verhinderung bzw. Verringerung von unspezifischen Bindungen und durch das Einbringen von
- 25 (zelltypspezifischen) zellbindenden Liganden in die Komplexe kann ein spezifisches Targeting zu bestimmten Zellen, Organen oder Geweben (z.B. Tumorgewebe) und damit eine zielgerichtete Genexpression (z.B. im Tumorgewebe) nach systemischer Verabreichung erzielt
- 30 werden (Beispiel 12).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde gezeigt, daß die erfindungsgemäßen, durch PEGylierung stabilisierten Komplexe aufgrund ihrer längeren Zirkulationszeit im Blut die Möglichkeit haben, in Bereichen mit erhöhter

Gefäßpermeabilität bzw. Gefäßschädigungen aus dem Blutgefäßsystem in die umliegenden Gewebe auszutreten und dort zu akkumulieren. Bereiche, wo ein solches „passives Targeting“ verstärkt auftritt, sind gut  
5 durchblutete Tumore sowie Entzündungsbereiche.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann u.a. vorteilhaft für die Therapie von Tumorerkrankungen verwendet werden, um intratumoral DNA zu verabreichen, enthaltend, insbesondere auf einem Plasmid, eine  
10 Sequenz, kodierend für ein oder mehrere Zytokine, wie Interleukin-2, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , oder ein Selbstmordgen, das in Kombination mit dem Substrat zur Anwendung kommt, wie das Herpes Simplex Thymidinkinase-Gen (mit Ganciclovir) oder das Linamarase-Gen (mit  
15 Linamarin), oder eine DNA, kodierend für ein apoptoseinduzierendes Protein, wie p53 oder Apoptin, oder für ein Toxin, wie das Diphtherietoxin, oder für ein zytotoxisch wirkendes Enzym.

Eine weitere Anwendung, bei der die Vorteile der  
20 erfindungsgemäßen Zusammensetzung zum Tragen kommen, ist die sog. genetische Tumorstimmung. Die dabei zur Anwendung kommenden Komplexe enthalten DNA, kodierend für ein oder mehrere Tumorstimmantigene oder Fragmente davon, gegebenenfalls in Kombination mit DNA, kodierend für ein  
25 oder mehrere Zytokine.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung liegt bevorzugt als Lyophilisat vor, gegebenenfalls unter Zusatz von Zucker, wie Saccharose oder Dextrose, in einer Menge, die in der gebrauchsfertigen Lösung eine  
30 physiologische Konzentration ergibt. Die Zusammensetzung kann auch in Form eines Kryokonzentrats vorliegen.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann auch tiefgefroren (kryokonserviert) oder als gekühlte Lösung vorliegen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung für die Transfektion von Säugetierzellen, bei dem zunächst Komplexe aus verdünnten Lösungen der Komplexpartner hergestellt und anschließend auf eine Konzentration von mindestens 200 µg/ml gebracht werden.

Das Aufkonzentrieren der Komplexe kann mittels herkömmlicher Methoden, z.B. durch Ultrafiltration oder durch Ultrazentrifugation, vorgenommen werden.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können gegebenenfalls in Form eines Kits vorliegen, wobei die Einzelkomponenten DNA einerseits und Polymer-modifiziertes PEI, an das gegebenenfalls ein Ligand gekoppelt ist, andererseits, in getrennten Behältern vorliegen.

#### Figurenübersicht

Fig. 1: Unterdrücken der Aggregatbildung von DNA/PEI-Komplexen durch Mischen unter salzfreien Bedingungen

Fig. 2: Stabilisieren von DNA/PEI-Komplexen mit Polyethylenglykol (PEG)

a) Kovalente Kopplung von PEG nach der Komplexbildung der DNA mit PEI  
b) Kovalente Kopplung von PEG an PEI vor der Komplexbildung mit DNA  
c) Abhängigkeit der Partikelgröße von der Konzentration an DNA und PEI bei der Komplexbildung

- Fig. 3: Für die Stabilisierung der Komplexe ist die kovalente Bindung von PEG entscheidend
- Fig. 4: Konzentrierung von PEG-stabilisierten DNA/PEI Komplexen
- 5 Fig. 5: Interaktion von DNA/PEI Komplexen mit humanem Plasma (Immunoblot)
- Fig. 6: Verringerung der Proteinbindung an DNA/PEI Komplexe durch Modifizierung mit PEG  
A) Silberfärbung  
10 B) Überprüfung der Filtrierbarkeit
- Fig. 7: Effekt der PEG-Modifizierung auf den Gentransfer in K562-Zellen
- Fig. 8: Effekt der PEG-Modifizierung auf den Gentransfer in murine Neuroblastomzellen
- 15 Fig. 9: Verringerung der unspezifischen Aufnahme der Komplexe durch P388 Mausemakrophagen durch Modifizieren der Komplexe mit PEG
- Fig. 10: Verringerung der Wechselwirkung mit Plasmaproteinen durch Modifizieren von  
20 DNA/Tf-PEI Komplexen mit PEG
- Fig. 11: PEGylierung von DNA/TfPEI-Komplexen erhöht die Beständigkeit der Komplexe im Blut nach der *in vivo* Anwendung
- 25 Fig. 12: Bestimmung der Bioverteilung von PEGylierten DNA/TfPEI-Komplexen nach systemischer Verabreichung mittels Southern-Blot
- A) intaktes plus teilweise abgebautes Reporter-gen-Plasmid
- B) intaktes Reporter-gen-Plasmid

- Fig. 13: Zielgerichtete Genexpression im Tumorgewebe nach systemischer Verabreichung von PEGylierten DNA/TfPEI-Komplexen
- 5 Fig. 14: Messung des Zeta-Potentials: verringerte Oberflächenladung von PEGylierten DNA/TfPEI- und DNA/PEI-Komplexen
- Fig. 15: Effekt der PEG-Modifizierung kleiner und großer Komplexe auf den Gentransfer in Säugerzellen
- 10 Fig. 16: Effekt der PEG-Modifizierung auf den EGF-vermittelten Gentransfer in Säugerzellen
- Beispiel 1: Unterdrücken der Aggregatbildung von DNA/PEI-Komplexen durch Mischen unter
- 15 salzfreien Bedingungen
- Die Bildung der Komplexe erfolgte durch Mischen von gleichen Volumina (250 µl) verdünnter Lösungen von Plasmid-DNA, enthaltend die für das Reportergen Luciferase kodierende Sequenz (10 µg des Plasmids pCMVL, beschrieben in der WO 93/07283) und 7,5 µg PEI (N/P-Wert: 6,0) bzw. 9 µg PEI (N/P-Wert 7,2) durch rasches, mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Lösungen, um eine möglichst schnelle Mischung der beiden Komponenten zu erreichen. Es wurde PEI mit einem Molekulargewicht von
- 20 800000 Dalton verwendet (Fluka). Die Endkonzentration an DNA im Komplex betrug 20 µg/ml. Für Transferrin (Tf) enthaltende Komplexe wurden Konjugate mit kovalent an PEI gebundenem Tf verwendet, deren Herstellung von Kircheis et al., 1997, beschrieben wurde. Es wurden zwei
- 25 verschiedene Konjugate verwendet: Tf2PEI (molares Verhältnis von Tf/PEI 2/1) und Tf4PEI (molares Verhältnis von Tf/PEI 4/1). Der Vergleich der
- 30

Komplexmischung in HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,3); in entionisiertem Wasser (MQ) allein und in MQ mit 5 % Glukose ist in Fig. 1 dargestellt. Die mittlere Partikelgröße wurde nach verschiedenen Zeiten mittels  
5 quasielastischer Laserlichtstreuung (Brookhaven BI-90) gemessen. Es zeigte sich, daß Komplexe in HBS schon nach kurzer Zeit aggregierten, während Komplexe, die in entionisiertem Wasser hergestellt wurden, eine stabile Größe aufwiesen, die durch eine physiologische  
10 Glukosekonzentration nicht wesentlich beeinträchtigt wurde.

Beispiel 2: Stabilisieren von DNA/PEI-Komplexen mit Polyethylenglykol (PEG)

15 a) Kovalente Kopplung von PEG nach der Komplexierung der DNA mit PEI

Die DNA/PEI-Komplexe mit einem N/P Verhältnis von 6.0 wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, gemischt und zur vollständigen Komplexierung 40 min bei Raumtemperatur  
20 (RT) gelagert. Anschließend wurden 69 µg Methoxy-succinimidyl-propionat-PEG (M-SPA-PEG, Molekulargewicht von 5000 Dalton, Shearwater Polymers, Inc., USA, Stammlösung 10 mg/ml in DMSO) in 50 µl MQ Wasser zugesetzt. (Dabei entsteht zwischen M-SPA-PEG und den  
25 Aminogruppen des PEI eine kovalente Bindung.) Die Reaktionsdauer betrug 20 min bei RT; das Gewichtsverhältnis (w/w) von PEG zu PEI betrug 9,2.

Die Komplexgröße wurde nach verschiedenen Zeiten mittels quasielastischer Laserlichtstreuung gemessen. Um die  
30 erfolgreiche Stabilisierung der Komplexe zu zeigen, wurden der Komplexlösung ein 250 µl Aliquot PBS (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) zugesetzt. Durch diese Erhöhung der Salzkonzentration

wurde die Aggregation von sterisch nicht stabilen Komplexen hervorgerufen, während die PEG-modifizierten Komplexe keine Größenveränderung zeigten (Fig. 2a).

b) Kovalente Kopplung von PEG an PEI vor der  
5       Komplexbildung mit DNA

Die PEGylierung von PEI vor der Komplexierung ("pre-PEGylierung") wurde wie folgt durchgeführt: 7,5 µg PEI wurden mit 6,9 µl M-SPA-PEG 10 mg/ml in DMSO gemischt und die Reaktion nach 20 min bei RT durch Zugabe von  
10 0,2 µMol Glycin abgestoppt. (Dabei reagiert das noch vorhandene freie M-SPA-PEG mit der Aminogruppe des Glycin.) Nach weiteren 20 min wurde die Lösung mit MQ auf 250 µl aufgefüllt und, wie in Beispiel 2a beschrieben, mit 10 µg DNA komplexiert. Die weitere  
15 Vorgangsweise erfolgte ebenfalls wie in Beispiel 2a beschrieben.

Die verwendeten Komplexe wiesen einen N/P-Wert von 6,0 auf, das Verhältnis von PEG/PEI betrug 9,2 (w/w).

Die nachträgliche PEGylierung ("post-PEGylierung") der  
20 Komplexe erfolgte wie in Beispiel 2a beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, daß auch mit vorhergehender PEGylierung von PEI sterisch stabile Komplexe gebildet werden können, der durchschnittliche Durchmesser der Partikel ist aber etwas größer als bei nachträglicher  
25 PEGylierung (Fig. 2b).

c) Abhängigkeit der Partikelgröße von der Konzentration und DNA und PEI bei der Komplexbildung

Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, in MQ gemischt, mit PEG modifiziert und der mittlere  
30 Partikeldurchmesser mittels LLS gemessen. Die DNA-Konzentration bei der Komplexbildung betrug 20 bzw. 320 µg/ml. Die Größenmessung erfolgte nach der

PEGylierung. Es zeigte sich deutlich, daß durch Mischen in höheren Konzentrationen mehr Aggregate entstehen (Fig. 2c).

- 5 Beispiel 3: Für die Stabilisierung der Komplexe ist die kovalente Bindung von PEG entscheidend

In diesem Experiment wurde ein Gewichtsverhältnis von PEG zu PEI von 9,2 gewählt. Es wurde einerseits, wie in den vorigen Beispielen, Methoxy-succinimidyl-propionat-  
10 PEG (M-SPA-PEG 5000) verwendet, andererseits PEG unterschiedlichen Molekulargewichtes ohne reaktive Gruppen (6000 D: Merck, No. 807491; 4000 d: Loba Feinchemie, No. 81252; 1500 d: Merck, No. 807489) mit  
15 1500 Dalton verwendet. Die Komplexgröße wurde nach verschiedenen Zeiten mittels quasielastischer Laser Lichtstreuung gemessen. Nach PEGylierung wurde der Komplexlösung ein 250 µl Aliquot PBS zugesetzt. Fig. 3 zeigt, daß nur kovalente Bindung von PEG an den Komplex  
20 die Aggregation der Komplexe nach Salzzugabe verhindert.

Beispiel 4: Konzentrierung von PEG-stabilisierten DNA/PEI Komplexen

25 Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, gemischt und, wie in Beispiel 2 beschrieben, mit M-SPA-PEG stabilisiert. Nach der Stabilisierung und Zugabe von 250 µl PBS wurde die Komplexlösung (ca. 800 µl) in Mikrokonzentratoren (Vivaspin 500, molekulares  
30 Ausschlußvolumen 100000 Dalton) mit 12000 g bis auf ein Volumen von ca 25 µl und somit eine DNA Konzentration von ca 400 µg/ml DNA konzentriert. Anschließend wurde

mit MQ wieder eine Konzentration von 20 µg/ml eingestellt und die Größe mittels quasielastischer Laser Lichtstreuung gemessen. Fig. 4 zeigt, daß ohne PEG-Modifizierung nach dem Konzentrieren aufgrund

- 5 Aggregation und/oder Absorption der Komplexe an die Membran keine sinnvollen Partikelgrößen mehr gemessen werden konnten, während die stabilisierten Komplexe auch nach Konzentrierung keine Aggregatbildung aufwiesen.

10 Beispiel 5: Interaktion von DNA/PEI Komplexen mit humanem Plasma

- Dieses Experiment diente dazu, die Interaktion von Plasmaproteinen mit den PEI-Komplexen zu bestimmen, wobei die an die Komplexe gebundenen Proteine zusammen  
15 mit diesen abgetrennt wurden.

- Es wurde humanes Citratplasma (Sigma) verwendet. In diesem Experiment wurden die Komplexe in folgender Weise gemischt: 12,8 µg DNA in 20 µl MQ wurden mit 9,6 µg PEI in ebenfalls 20 µl MQ gemischt und wie in Beispiel 2  
20 beschrieben modifiziert. Anschließend wurden die Komplexe mit einem Aliquot verdünntem Plasma 30 min bei 37°C inkubiert.

a) Identifizierung der an DNA/PEI Komplexe bindenden Plasma-Proteine

- 25 In diesem Experiment wurden 40 µl Komplex mit einer DNA-Konzentration von 320 µg/ml mit 140 µl 1:70 verdünntem Plasma 30 min bei 37°C inkubiert. Die Komplex/Plasma Lösung wurde auf Mikrofiltrationseinheiten mit einer Filter-Porengröße von 0,2 µm (Whatman, England, Anopore  
30 membrane) aufgetragen. Die Membran wurde vorher mit einer BSA Lösung (1 mg/ml) abgesättigt und dreimal mit HBS (20 mM HEPES pH 7.3, 145 mM NaCl) gewaschen, um

unspezifische Proteinbindung zu reduzieren. Die aufgetragene Lösung wurde bei 12000 g filtriert und dreimal mit HBS gewaschen. Das am Filter zurückgebliebene Material (Komplexe plus Plasmaproteine) wurde mit HBS + 5% SDS eluiert ("Eluat") und wie das Filtrat der Komplex/Plasmaplösung ("Filtrat") nach Zugabe von einem Aliquot fünffach konzentrierten nichtreduzierendem Probenpuffer (25 % Glyzerin (w/v); 290 mM TRIS pH 6,8; 0,25 % SDS (w/v); 0,1 mg/ml Bromphenolblau) auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit einem Polymergradienten von 2,5 bis 12 % aufgetrennt.

Für die immunologische Identifizierung der Proteine wurde das Gel in einer "semi dry" Blot-Apparatur (Bio Rad) auf eine Nitrozellulosemembran geblottet, unspezifische Bindungsstellen mit einer 1%igen Milchpulverlösung abgesättigt und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Die Antikörper wurden in TBST (150 mM NaCl; 10 mM TRIS pH 8,0; 0,1 % TWEEN 20) verdünnt.

#### 1. Antikörper:

Ziege anti-human Complement C3 (fraktioniertes Antiserum, Sigma, Best. No. C-7761, Lot Number 054H8842), Verdünnung 1:3000.

Ziege anti-human Fibrinogen (fraktioniertes Antiserum, Sigma, Best. No. F-2506, Lot Number 115H8828), Verdünnung 1:3000. Ziege anti-human Fibronectin (fraktioniertes Antiserum, Sigma, Best. No. F-1909, Lot Number 094H8868), Verdünnung 1:3000.

#### 2. Antikörper:

Maus anti-Ziege IgG, HRP konjugiert (polyklonal, Jackson Laboratories, Best. No. 205-035-108, Lot Number 33740), Verdünnung 1:25000

Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran mehrfach mit TBST gewaschen und anschließend in Luminol/Enhancer Lösung (Pharmacia, No. 1856135) und Stabiler Peroxid Lösung (Pharmacia, No. 1856136) 1/1 (v/v) 10 min bei RT inkubiert, mehrfach mit TBST gewaschen und ein Film auf dem Blot exponiert.

Der Immunoblot ist in Fig. 5 dargestellt. Es zeigte sich, daß Komplement C3, Fibrinogen, und Fibronectin an die DNA/PEI Komplexe im Eluat binden; ein Effekt, der nach PEGylierung (die Komplexe wurden, wie in Beispiel 2, PEGyliert) deutlich verringert wird (s. Spuren 4 und 5). Die Kontrollen (Spuren 6 und 7) dienten dazu festzustellen, in welchem Ausmaß diese Proteine ohne Anwesenheit von Komplex an die Filtermembran binden. Bei der Plasmaprobe ohne DNA-Komplexe findet sich das Protein erwartungsgemäß hauptsächlich im Filtrat, im Eluat konnten keine nennenswerten Mengen der Proteine gefunden werden (Spur 1: Humanplasma, 3 µl, 1:50 verdünnt; Spur 2: DNA/PEI + Plasma, Filtrat, 6 µl; Spur 3: DNA/PEI + Plasma, Eluat, 20 µl; Spur 4: 150 µl Plasma, 1:70 verdünnt, Filtrat, 6 µl; Spur 5: 150 µl Plasma, 1:70 verdünnt, Eluat, 20 µl).

b) Verringerung der Proteinbindung an DNA/PEI Komplexe durch Modifizierung mit M-SPA-PEG

Es wurden Komplexe wie in a) beschrieben gemischt und wie in Beispiel 2 beschrieben mit M-SPA-PEG modifiziert. Die Inkubation mit Plasma, Filtration, Eluierung und elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie in Beispiel 5a beschrieben. Zum semiquantitativen Nachweis wurden die aufgetrennten Proteine mit Silberfärbung (geingfügig modifizierte Methode nach Bloom et al., 1987) angefärbt.

Wie aus Fig. 6a ersichtlich, binden an PEG-modifizierte Komplexe (Spur 5, Eluat) deutlich weniger (nicht

sichtbare) Proteinmengen als an unmodifizierte Komplexe (Spur 3). Spur 1: Humanplasma, 3 µl, 1:50 verdünnt; Spur 2: DNA/PEI + Plasma, Filtrat, 6 µl; Spur 3: DNA/PEI + Plasma, Eluat, 20 µl; Spur 4: DNA/PEI-PEG PEG/PEI 9,2/1 (w/w)+ Plasma, Filtrat, 6 µl; Spur 5: DNA/PEI-PEG PEG/PEI 9,2/1 (w/w)+ Plasma, Eluat, 20 µl; Spur 6: 150 µl Plasma, 1:70 verdünnt, Filtrat, 6 µl; Spur 7: 150 µl Plasma, 1:70 verdünnt, Eluat, 20 µl.

c) Überprüfung der Filtrierbarkeit von DNA/PEI  
10       Komplexen:

Um sicherzugehen, daß nach der Filtration ein Großteil der Komplexe auf der Membran zurückgehalten wird, wurden Komplexe (DNA-Konzentration von 320 µg/ml), wie in Beispiel 5a beschrieben, gemischt und PEGyliert.  
15       Anschließend wurden die Komplexe durch eine mit BSA abgesättigte Membran filtriert und 3 mal mit je 300 µl HBS gewaschen. Die Absorption der Lösung (A<sub>260</sub>; (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) vor der Filtration (A<sub>260</sub> vor Filtration), des Filtrates (A<sub>260</sub>  
20       Filtrat) und der drei Waschlösungen (Wasch 1 bis Wasch 3) wurde gemessen. Fig. 6b zeigt, daß unmodifizierte Komplexe vollständig und PEGylierte Komplexe zum Großteil zurückgehalten werden.

25       Beispiel 6: Effekt der PEG-Modifizierung auf den Gentransfer in Säugerzellen

a) Transfektion der humanen Zelllinie K562 mit PEG-modifizierten DNA/(Tf)PEI-Komplexen

Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, gemischt und wie in Beispiel 2 beschrieben mit M-SPA-PEG modifiziert. Die DNA-Konzentration bei der  
30       Komplexbildung betrug 20 µg/ml, das Verhältnis von DNA

zu PEI betrug N/P 7,2. Es wurden PEI bzw. Tf-PEI Konjugate zur DNA-Komplexierung verwendet, das molare Verhältnis von Tf zu PEI im Konjugat betrug 2/1 (Tf<sub>2</sub>PEI). Das Verhältnis von PEG/PEI betrug 2,3/1 bzw. 3,7/1 und 7,4/1 (w/w); das entspricht einem molaren Verhältnis von 0.25:1, 0.4:1 bzw 0.8:1.

Die Kultivierung der Zellen (ATCC CCL-243 K-562) erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 100 iU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Pro Transfektionsansatz wurden 500000 Zellen in 24-well Platten (Durchmesser 22,6 mm, Costar) ausgesät. Die Transfektion erfolgte in serumfreiem Medium. Nach vier Stunden wurde das Medium durch serumhaltiges Medium ersetzt. 24 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100 µl Erntepuffer geerntet (250 mM TRIS, pH 7.2, 0,5 % Triton X 100), homogenisiert, zentrifugiert und je 10 µl aus dem Überstand für die Luciferaseaktivitätsbestimmung in 100 µl Probenpuffer (25 mM Glycylglycin pH 7.8, 5 mM ATP, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) verdünnt. Die Messung erfolgte nach Injektion von 100 µl Injektionspuffer (200 µM Luziferin (Sigma), 20 mM 25 mM Glycylglycin pH 7.8) in eine Berthold Lumat LB 9507, die Ergebnisse sind in Fig. 7 dargestellt.

b) Transfektion einer murinen Neuroblastom-Zelllinie mit PEG-modifizierten DNA/(Tf)PEI Komplexen

Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, gemischt und, wie in Beispiel 2 beschrieben, mit M-SPA-PEG modifiziert.

Die DNA-Konzentration bei der Komplexbildung betrug 20 µg/ml, das Verhältnis von DNA zu PEI betrug N/P 7,2. Das Verhältnis von PEG/PEI betrug 3,5/1 bzw. 7,0/1 (w/w); das entspricht einem molaren Verhältnis von 0.38:1 bzw. 0.76:1.

Es wurden PEI bzw. Tf-PEI Konjugate zur DNA-Komplexierung verwendet, das molare Verhältnis von Tf zu PEI im Konjugat betrug 2/1 (Tf<sub>2</sub>PEI).

- Die Kultivierung der Zellen (ATCC CCL 131 Neuro 2A) erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 100 iU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Pro Transfektionsansatz wurden 300000 Zellen in 6-well Platten (Durchmesser 35 mm, Costar) ausgesät. Die Transfektion erfolgte in serumfreiem Medium. Nach vier Stunden wurde das Medium durch serumhaltiges Medium gewechselt. 24 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen in 100 µl Erntepuffer geerntet (250 mM TRIS, pH 7.2, 0,5 % Triton X 100), homogenisiert, zentrifugiert und je 10 µl aus dem Überstand für die Luciferaseaktivitätsbestimmung in 100 µl Probenpuffer (25 mM Glycylglycin pH 7.8, 5 mM ATP, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) verdünnt. Die Messung erfolgte nach Injektion von 100 µl Injektionspuffer (200 µM Luziferin (Sigma), 20 mM 25 mM Glycylglycin pH 7.8) in eine Berthold Lumat LB 9507.
- Fig.7 und 8 zeigen, daß Modifizieren von DNA/PEI und DNA/TfPEI Komplexen den unspezifischen Gentransfer (über PEI vermittelt) stark reduziert , während der rezeptorvermittelte spezifische Gentransfer (über TfPEI vermittelt) nicht (Fig. 7) bzw. in Abhängigkeit vom Zelltyp nur geringfügig (Fig. 8) beeinträchtigt wird.

Beispiel 7: Verringerung der unspezifischen Aufnahme der Komplexe durch P388 Mausemakrophagen durch Modifizieren der Komplexe mit PEG

- Die Aufnahme der Komplexe durch die Zellen wurde mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsorter (FACS) durchgeführt (FACScan, Becton Dickinson). Die

Anregungswellenlänge des Lasers betrug 488 nm. Die Fluoreszenz wurde bei 515 nm gemessen.

Die DNA-Konzentration bei der Komplexbildung betrug 320 µg/ml, der N/P-Wert 6,0. Das Verhältnis von PEG/PEI betrug 9,2:1; das entspricht einem molaren Verhältnis von 01:1.

Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 5a beschrieben, gemischt und, wie in Beispiel 2 beschrieben, mit M-SPA-PEG modifiziert. Die DNA wurde vor der Komplexierung mit YOYO1 (1,1'-(4,4,7,7,-tetramethyl-4,7-diazaundecamethylen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazol)-2-methyliden]-quinolinium tetraiodid; Molecular Probes) in einem molaren Verhältnis von 100:1 (Basenpaare DNA:YOYO1) markiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (Dulbeccos modified eagle medium) mit 4500 mg/ml Glucose, 100 iU/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Pro Ansatz wurden 300000 Zellen in 35 mm Petrischalen (Falcon No 1008) ausgesät. Die Inkubation mit den Komplexen erfolgte in serumfreiem Medium bei 37°C. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 mM EDTA in PBS geerntet.

Das Ergebnis der FACS-Analyse ist in Fig. 9 dargestellt (A: DNA/PEI +/- M-SPA-PEG 37°C, PEG/PEI 9,2/1 w/w).

B: DNA/Tf<sub>2</sub>PEI +/- M-SPA-PEG 37°C; PEG/PEI 9,2/1 w/w).

Die X-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität der gemessenen Zellen, die Y-Achse die Anzahl der gemessenen Ereignisse. Die FACS Daten zeigen, daß durch die PEGylierung die Bindung und Aufnahme der Komplexe an Makrophagen deutlich reduziert wird. Dies zeigt sich in der deutlich verringerten Fluoreszenz der Zellen.

Beispiel 8: Verringerung der Wechselwirkung mit  
Plasmaproteinen durch Modifizieren von  
DNA/Tf-PEI Komplexen mit PEG

Es wurden DNA/Tf2-PEI-Komplexe hergestellt, wie in  
5 Beispiel 1 beschrieben (in Wasser gemischt), und, wie in  
Beispiel 2 beschrieben, mit PEG modifiziert. Die DNA-  
Konzentration betrug 20 µg/ml, der N/P-Wert betrug 7,2.  
Das Verhältnis von PEG:PEI betrug 3,5:1 bzw. 7,0:1  
(w/w); das entspricht einem molaren Verhältnis von  
10 0,38:1 bzw. 0,76:1. Nach der PEGylierung wurden 500 µl  
Komplex mit 7,2 µl Plasma bei 37°C inkubiert. Zu den in  
Fig. 10 angegebenen Zeitpunkten wurde die Partikelgröße  
mittels LLS gemessen. Es wurde festgestellt, daß  
unmodifizierte Komplexe nach Inkubation mit Plasma  
15 Aggregate bilden, während PEGylierte Komplexe  
hinsichtlich ihrer Größe nicht von verdünntem Plasma  
unterscheidbar waren. Da die Versuche in entionisiertem  
Wasser durchgeführt wurden, konnte ein etwa durch Salz  
hervorgerufener Effekt ausgeschlossen werden.

20

Beispiel 9 Herstellung von Transfektionskomplexen

DNA/TfPEI-Komplexe wurden hergestellt und PEGyliert,  
wie in den Beispielen 1 bzw. 2 beschrieben. Standard-  
DNA/TfPEI-Komplexe (TfPEI-Konjugat: molares Verhältnis  
25 von ca. 4 Transferrinmolekülen, gebunden an PEI,  
800 kDa) wurden mit einem N/P-Verhältnis von 6.0 bei  
einer DNA-Konzentration von 100 µg/ml gemischt. Die  
Komplexe wurden in Wasser oder 0.5 x HBS (75 mM NaCl,  
10 mM HEPES pH 7.4) gemischt. Um Iso-Osmolarität zu  
30 gewährleisten, wurde Glukose bei einer Endkonzentration  
von 5 % bzw. 2.5 % (w/v) zugegeben.

PEGylierte DNA/TfPEI-Komplexe (DNA/TfPEI/PEG; N/P 6.0,  
PEG/PEI 10/1 w/w, 1 h PEGylierung bei Raumtemperatur)

wurden bei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml  
gemischt. Die Komplexe wurden in Wasser, 0.3 x HBS  
(50 mM NaCl, 7 mM HEPES pH 7.4) oder 0.5 x HBS  
gemischt. Um Iso-Osmolarität zu gewährleisten, wurde  
5 Glukose bei einer Endkonzentration von 5 %, 3.3 % bzw.  
2.5 % (w/v) zugegeben. Die PEGylierten DNA/TfPEI-  
Komplexe wurden mittels VIVA-spin-4000-  
Microkonzentrator auf eine DNA-Endkonzentration von  
200 µg/ml konzentriert, wie in Beispiel 4 beschrieben.

10

Beispiel 10 PEGylierung von DNA/TfPEI-Komplexen erhöht  
die Beständigkeit der Komplexe im Blut nach  
der *in vivo* Anwendung

15 a) Anwendung der Transfektionskomplexe *in vivo* im  
Tiermodell

250 µl PEGylierte Komplexe (enthaltend 50 µg DNA) oder  
250 µl Standardkomplexe (enthaltend 25 µg DNA) wurden  
in die Schwanzvene von weiblichen A/J Mäusen  
(9-12 Wochen alt) injiziert. Zu den in Fig. 11  
20 angegebenen Zeiten nach der Verabreichung der  
Transfektionskomplexe wurden die Tiere mittels  
zervikaler Dislokation getötet. Das Blut wurde in  
Eppendorf-Röhrchen gesammelt und sofort mit  
Natriumcitrat bei einer Endkonzentration von 25 mM  
25 gemischt. Das Plasma wurde von den Blutzellen durch  
Zentrifugation (10 min, 1000 g bei Raumtemperatur)  
getrennt.

b) Isolierung von genomischer und Plasmid-DNA aus Blut  
und Plasma

30 Die Isolierung der DNA wurde nach dem QIAamp Tissue Kit  
Protokoll (Quiagen Cat. No. 29304) durchgeführt. Zu  
jedem Aliquot (100 µl) von Blut bzw. Plasma wurden

während der anfänglichen Inkubation bei 70°C 10 µl Heparin (Heparin „Novo“, 1000 IE/ml, Novo Nordisk) gegeben, um die quantitative Isolierung von Plasmid-DNA zu gewährleisten (es hatte sich gezeigt, daß die  
5 Komplexe in Gegenwart von Heparin dissoziieren).

c) Southern Blotting

Das Agarose-Gel wurde nach Standardvorschrift (Sambrook et al., 1989) 45 min lang denaturiert (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH), mit destilliertem Wasser gewaschen und  
10 30 min lang in 1 M Tris/1.5 M NaCl 30 min lang gespült. Der Transfer auf Nylonmembranen (Gene Screen, DuPont, NEF983) wurde mittels Kapillartransfer in 10 x SSC vorgenommen; die DNA wurde mittels UV-Strahlung auf die Filter quervernetzt. Die Hybridisierung und das Waschen  
15 wurde nach den Empfehlungen des DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim ; Cat. No. 1585614) durchgeführt. Die Filter wurden 4 h lang prähybridisiert und über Nacht mit der DIG-markierten Sonde bei 42°C in 50 % Formamid,  
20 5 x SSC, 0.1 % N-Lauroylsarcosin, 0.02 % SDS, 2 % Blockierungsreagens und 100 µg/ml Hefe-tRNA hybridisiert. Die abschließende Waschung wurde in 0.5 x SSC, 0.1 % SDS bei 68°C vorgenommen.

Die Hybridisierungssonde wurde vom Plasmid pCMVL (Plank et al., 1992) mittels DIG-Markierung nach Vorschrift  
25 des Herstellers (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II; Boehringer Mannheim) erhalten.

Der immunologische Nachweis wurde mit dem im Kit  
30 enthaltenen Substrat oder bevorzugt mit Vistra ECF Substrat (Amersham Cat. No. RPN5785), das in einem Phosphor Imager (Molecular Dynamics) quantitativ bestimmt werden kann, durchgeführt. Die Inkubation mit dem Vistra-Substrat wurde über Nacht durchgeführt.

Schätzung der Plasmid-DNA-Menge: auf jedes Agarose-Gel wurden unterschiedliche Mengen von pCMVL (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg bzw. 0.5 pg) geladen, um die Intensität der auf den Blots nachgewiesenen Banden direkt zu

5 vergleichen. Die Gesamtmenge an DNA im Plasma wurde aus den erhaltenen Werten berechnet. Das Ergebnis ist in Fig. 11 dargestellt. Es zeigt, daß mit Standard-DNA/TfPEI-Komplexen (ohne PEGylierung) nach 30 min nur 1 % der injizierten DNA (ca. 300 ng) im Plasma

10 nachweisbar ist. Zum selben Zeitpunkt können im Fall der PEGylierten DNA/TfPEI-Komplexe noch mehr als 20 % DNA (10000 ng) nachgewiesen werden. Zwei Stunden nach der Injektion kann mit PEGylierten Komplexen eine mehr als 10-fach höhere DNA-Menge (1500 ng)

15 nachgewiesen werden als mit nicht-PEGylierten Standard-Komplexen (100 ng). In beiden Fällen ist ein Teil der DNA abgebaut. Bei Einsatz von nicht-PEGylierten Standardkomplexen mit 50 µg (statt 25 µg) DNA wurden vergleichbare Ergebnisse (0.5% DNA im Plasma) wie mit

20 25 µg erzielt.

Beispiel 11 Bioverteilung von PEGylierten  
DNA/TfPEI-Komplexen nach systemischer  
Verabreichung

25 Die PEGylierten DNA/TfPEI-Komplexe wurden hergestellt, wie in Beispiel 9 beschrieben; das verwendete Tiermodell war analog zu dem von Beispiel 10, jedoch wurden diese, sowie alle weiteren *in vivo* Studien in tumortragenden Mäusen durchgeführt. Dazu wurden

30 weibliche A/J Mäuse subkutan mit  $2 \times 10^6$  Neuroblastomzellen (Neuro2a, ATCC CCL 131) injiziert. Nach zwei Wochen, als die Tumore ca. 10 bis 14 mm Größe erreicht hatten, wurden die Transfektionskomplexe in die Schwanzvene injiziert.

a) Verabreichung der Transfektionskomplexe *in vivo*

250 µl PEGylierte DNA/TfPEI-Komplexe (enthaltend 50 µg DNA; N/P=4.8 oder 6) wurden in die Schwanzvene von A/J Mäusen injiziert. Einen Tag nach der Verabreichung  
5 der Transfektionskomplexe wurden die Tiere getötet und die in Fig. 12 angegebenen Gewebe entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

b) Isolierung von genomischer und Plasmid-DNA

- 10 Die DNA-Isolierung wurde ähnlich wie in Beispiel 10 nach der Vorschrift des QIAamp Tissue Kit vorgenommen. Anders als im Beispiel 10, wurde in diesem Fall kein Heparin zugegeben (der im Kit vorhandene Lysepuffer für Gewebe war ausreichend, die Komplexe zu dissoziieren).
- 15 Es wurde das genaue Gewicht der Mausorgane bestimmt. Pro 25 mg (Milz: 10 mg) wurden 80 µl PBS/10 mM EDTA zur Homogenisierung der Gewebe in Dounce-Homogenisatoren verwendet. 100 µl Aliquots (Milz: 250 µl) wurden verwendet, um die DNA zu isolieren.
- 20 Um das Blotzen der Gesamt-DNA zu erleichtern, wurde die Hälfte der eluierten DNA (1/10 der DNA aus den Mausschwänzen) mit EcoRI (Gibco BRL; 5 h in einem Gesamtvolumen von 300 µl mit 35 Einheiten EcoRI) verdaut. Die DNA wurde daraufhin mit Ethanol gefällt,  
25 einige Stunden in 25 µl TE (4°C) gelöst und auf ein 0.8 % Agarosegel geladen.

Der Southern Blot wurde wie in Beispiel 10 durchgeführt. Die Gesamtmenge an DNA aus jedem Organ wurde unter Berücksichtigung des Gesamtgewichts des  
30 Gewebes berechnet.

Fig. 12A zeigt die Mengen von pCMVL (intakt plus teilweise abgebaut), die mittels Southern Blot Analyse in den verschiedenen Geweben nachweisbar waren.

Fig. 12B zeigt die nachweisbaren Mengen von intaktem pCMVL. Nach systemischer Verabreichung von PEGylierten DNA/TfPEI-Komplexe wurden beträchtliche Mengen an DNA in der Leber, der Milz, dem Schwanz, der Lunge sowie im Tumor gefunden (geringe Mengen wurden auch in den Nieren gefunden). Interessanterweise wurden die größten Mengen an intakter DNA im Tumor, gefolgt von Schwanz und Leber, gefunden, während der größte Anteil an Gesamt-DNA, die in anderen Organen nachgewiesen wurde, abgebaut war (Fig. 12A).

Beispiel 12 Zielgerichtete Genexpression im Tumorgewebe nach systemischer Verabreichung von PEGylierten DNA/TfPEI-Komplexen

Die PEGylierten DNA/TfPEI-Komplexe wurden hergestellt, wie in Beispiel 9 beschrieben; das verwendete Tiermodell war identisch mit dem von Beispiel 10.

a) Verabreichung der Transfektionskomplexe *in vivo*

PEGylierte DNA/TfPEI-Komplexe (enthaltend 60-80 µg DNA/200-400 µl; N/P=6; Komplexe gemischt in 0.3 x oder 0.5 x HBS) oder nicht-PEGylierten Standard-DNA/TfPEI-Komplexe (enthaltend 80 µg DNA/300 µl; N/P=6; Komplexe gemischt in 0.3 x oder 0.5 x HBS) wurden in die Schwanzvene von A/J Mäusen injiziert. Zwei Tage nach der Verabreichung der Transfektionskomplexe wurden die Tiere getötet und die in Fig. 13 angegebenen Gewebe entnommen. Die Gewebe wurden in einem Puffer, enthaltend 250 mM TRIS pH 7.5 mittels eines IKA-Homogenisators („Ultraturax“) homogenisiert und in

flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zum Luciferase-Assay bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

b) Luciferase-Assay

Die Transfektionseffizienz wurde mittels Luciferase-Assay bestimmt. Dazu wurden Proben von homogenisiertem Gewebe drei Gefrier/Auftauzyklen unterworfen und 10 min bei 10000 g zentrifugiert, um den Niederschlag zu pelletieren. Die Luciferase-Lichteinheiten wurden unter Verwendung eines Lumat LB9501/16 (Berthold, Deutschland) aus einem Aliquot des Überstandes (50  $\mu\text{l}$ ) mit 10 s Integration nach automatischer Injektion der Luciferin-Lösung aufgezeichnet. Der Luciferase-Background (300-400 Lichteinheiten) wurde von jedem Wert abgezogen und die Transfektionseffizienz als relative Lichteinheiten (Relative Light Units, RLU) pro Organ/Gewebe ausgedrückt. Fig. 13 zeigt, daß mit nicht-PEGylierten Standard-DNA/TfPEI-Komplexen im Schwanz und in der Lunge eine beträchtliche Reportergenexpression stattfindet. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Komplexe entweder nahe der Injektionsstelle (Schwanz) lokalisiert bleiben oder daß sie rasch mit Plasmaproteinen aggregieren und folglich durch die Lungenkapillaren ausfiltriert werden. Die Verabreichung der Standard-Transfektionskomplexe ging mit einer schweren akuten Toxizität einher. Diese resultierte in einer ca. 50 %igen Lethalität der Mäuse, die eine Folge der Verstopfung der Lungenkapillaren durch die aggregierten Komplexe sein könnte. Im Tumor wurde nur eine äußerst niedrige Genexpression gefunden. Im Gegensatz dazu resultierte die systemische Verabreichung der PEGylierten DNA/TfPEI-Komplexe in einer beträchtlichen Reportergenexpression im Tumor und im Schwanz. In der Lunge wurde eine nur niedrige Expression nachgewiesen; in den anderen Organen wurde überhaupt keine Expression festgestellt. Die Toxizität

war im Vergleich zu den Standardkomplexen deutlich verringert.

5                    Beispiel 13   Messung des Zeta-Potentials: verringerte  
                         Oberflächenladung von PEGylierten  
                         DNA/TfPEI- und DNA/PEI-Komplexen

63 µg DNA in 100 µl Wasser wurden mit verschiedenen  
Mengen TfPEI (N/P 1.5: 12 µg; N/P 3.0: 23 µg; N/P 6.0:  
47 µg) in 100 µl komplexiert. Nach 30 min Komplexbildung  
10 wurden die Komplexe mit M-SPA-PEG5000 I (N/P 1.5:  
120 µg; N/P 3.0: 230 µg; N/P 6.0: 470 µg. Stammlösung  
20 mg/ml in DMSO) PEGyliert. Nach 1 h PEGylierung wurden  
die Komplexe mit Wasser (MQ) auf eine End-DNA-  
Konzentration von 50 µg/ml verdünnt. Die Zeta-  
15 Potentialmessung wurde in fünf Serienmessungen mit einem  
ZetaPALS Zeta-Potential-Analysators (Brookhaven) bei  
einer Feldstärke von 13.9 V/cm und 10 Hz nach der von  
Miller et al., 1991, beschriebenen Methode vorgenommen.  
Das Ergebnis der Messung, das in Fig. 14 dargestellt  
20 ist, zeigt, daß der Einbau von Transferrin in den  
Komplex bei N/P>3.0 die Oberflächenladung reduziert.  
Außerdem führt die PEGylierung zu einer weiteren  
Abschirmung der Oberflächenladung von negativ und  
positiv geladenen Komplexen.

25

Beispiel 14: Effekt der PEG-Modifizierung auf den  
Gentransfer in Säugerzellen

a) Herstellung von kleinen bzw. großen  
Transfektionskomplexen

30 Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben,  
gemischt und wie in Beispiel 2 beschrieben mit M-SPA-PEG  
modifiziert. 10 µg of pCMVL DNA wurden in 250 µl Puffer

- mit 7.5 µg PEI (800 kDa) oder Tf-PEI Konjugat (molares Verhältnis von Tf zu PEI im Konjugat 2/1, Tf<sub>2</sub>PEI) in 250 µl Puffer gemischt. Als Puffer wurde entweder HBG (5% Glukose in 10 mM HEPES pH 7.4) - für die kleinen Komplexe - oder HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.4) - für die großen Komplexe - verwendet. Nach 40 Minuten wurden 75µg M-SPA-PEG5000 zugesetzt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurden Komplexe ohne PEG-Modifikation hergestellt.
- 10 b) Transfektion der humanen Zelllinie K562 mit PEG-modifizierten kleinen bzw. großen DNA/(Tf)PEI-Komplexen
- Die Transfektion der K-562 Zellen (ATCC CCL-243) erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 100 iU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Pro Transfektionsansatz wurden 500000 Zellen in 24-well Platten (Durchmesser 22.6 mm, Costar) ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit je 2.5 µg DNA Komplex in 125 µl (-FCS Ansatz) oder 5 µg DNA Komplex in 250 µl (+FCS Ansatz). Nach vier Stunden wurde das Medium durch serumhaltiges Medium ersetzt. 24 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100 µl Erntepuffer geerntet und die Luciferaseexpression bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 15 dargestellt (RLU = Relative Lichteinheiten). Die Ergebnisse zeigen, daß die PEGylierung weder bei den kleinen noch den großen DNA-Komplexen einen negativen Einfluß auf die Gentransfereffizienz hat und daß man in beiden Fällen einen wesentlich höheren Gentransfer mit PEG-Transferrin-modifizierten Komplexen erzielt.

Beispiel 15: Effekt der PEG-Modifizierung auf den  
EGF-vermittelten Gentransfer in  
Säugerzellen

a) Herstellung von EGF-PEI-Konjugaten

5 Konjugate von Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) mit PEI  
(25 kDa) wurden hergestellt durch Modifikation der  
Komponenten mit SPDP (Pharmacia 17-0458-01), Überführung  
des modifizierten PEI in die Mercaptopropionat-Form und  
Kopplung über Disulfidbrückenbildung, in analoger Weise  
10 wie beschrieben von Kircheis et al, 1997.

4 mg (0.67  $\mu$ mol) EGF (EGF1, Serotec, murin) in 1 ml  
16 mM wäßrigem HEPES Puffer (pH 7.9) wurden mit 0.5 ml  
einer 20 mM ethanolischen h bei Raumtemperatur reagieren  
gelassen. Anschließend wurde zwei Tage lang gegen  
15 50% wäßriges Ethanol dialysiert (Membran mit  
Molekulargewichtsausschlußgrenze MWCO 1 kDa,  
Spectropor 7). Die Ausbeute an modifiziertem EGF betrug  
3.5 mg (87%) bei einem molarem Verhältnis  
EGF/Pydridinyldithiopropionat von 1:0.8. In analoger  
20 Weise wurde aus 1 mg EGF modifiziertes EGF in einer  
Menge von 0.7 mg hergestellt.

Mercaptopropionat-modifiziertes PEI (10.5 mg, molares  
Verhältnis PEI/ Pydridinyldithiopropionat von 1:2.8)  
wurde erhalten durch Modifikation von 50 mg PEI (25 kDa,  
25 Aldrich, über Pharmacia Sephadex G25 gelfiltrierte, in  
0.76 ml 0.25 M NaCl, als Hydrochloridform, pH 7) mit  
0.39 ml einer 20 mM ethanolischen SPDP Lösung, nach  
einer Stunde bei Raumtemperatur gefolgt von einer  
Gelfiltration (Sephadex G25, 10 x 300 mm Säule, Eluens  
30 0.25 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.3), Umsetzung eines Teils  
des Zwischenprodukts (20 mg PEI, enthaltend 1.45  $\mu$ mol  
Pyridinyldithiopropionat) mit 11 mg Dithiothreitol für  
eine Stunde unter Argon und Reinigung über Gelfiltration

(Sephadex G25, 10 x 100 mm Säule, Eluens 0.25 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.3, Argon-begast).

Pyridinyldithiopropionat-modifiziertes EGF (4.2 mg EGF, 0.56 µmol Pyridinyldithiopropionat) in 2.2 ml

- 5 50% wäßrigem Ethanol wurde mit Mercaptopropionat-modifiziertem PEI (7.5 mg PEI, 0.90 µmol Mercaptogruppen) in 1.1 ml 0.25 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.3 unter Argon umgesetzt. Nach vier Tagen bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung durch Zugabe
- 10 von 3M NaCl und Wasser auf 0.5 M NaCl und ein Gesamtvolumen von 4 ml eingestellt und mittels Ionenaustauschchromatographie (Biorad Macroprep High S, 100 x 10 mm, Puffer A: 20 mM HEPES pH 7.3; Puffer B: 3 M NaCl, 20 mM HEPES pH 7.3; Gradient 22% B bis 78% B)
- 15 aufgetrennt. Die Produktfraktion (Elution zwischen 2-3 M NaCl) wurde gegen HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.3) dialysiert und ergab ein Konjugat von 1.9 mg EGF modifiziert mit 6.35 mg PEI. Dies entspricht einem molaren Verhältnis EGF/PEI von 1.28:1.

20 b) Herstellung von Transfektionskomplexen

- Die Komplexe wurden, analog wie in Beispiel 1 beschrieben, gemischt und, wie in Beispiel 2 beschrieben, mit M-SPA-PEG modifiziert. 5 µg of pCMVL DNA wurden in 125 µl Puffer mit 3.75 µg PEI (25 kDa) als
- 25 unmodifiziertes PEI (Hydrochlorid), oder als 1:1 (w/w) Mischung von unmodifiziertem PEI (Hydrochlorid) mit EGF-PEI (siehe a)), in 125 µl Puffer gemischt. Als Puffer wurden entweder HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.4) oder 0.5x HBS (75 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7.4)
- 30 verwendet. Nach 30 Minuten wurden 37.5 µg M-SPA-PEG5000 zugesetzt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurden Komplexe ohne PEG-Modifikation hergestellt. Um Iso-Osmolarität zu

gewährleisten, wurde bei den 0.5 x HBS Komplexen Glukose bei einer Endkonzentration von 2.5 % (w/v) zugegeben.

c) Transfektion der humanen Zelllinie KB mit  
PEG-modifizierten DNA/(EGF) PEI-Komplexen

- 5 Pro Transfektionsansatz wurden 500000 KB Zellen (ATCC  
CCL-17) in T25 Flaschen (Costar) ausgesät. Die  
Transfektion erfolgte in je 2 ml DMEM Medium mit  
10 % fötalem Kälberserum (FCS) mit je 5 µg DNA Komplex  
in 250µl Lösung. Nach vier Stunden wurde das Medium  
10 durch weitere 2 ml an serumhaltigem Medium ergänzt.  
24 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen  
geerntet und die Luciferaseexpression bestimmt. Die  
Ergebnisse sind in Fig. 16 dargestellt. Die Ergebnisse  
zeigen, daß auch bei PEGylierung der in HBS bzw  
15 0.5 x HBS hergestellten DNA Komplexen die  
Gentransfereffizienz erhalten bleibt, und daß man in  
beiden Fällen einen wesentlich höheren Gentransfer mit  
EGF-modifizierten Komplexen erzielt.

## Literaturliste

- Abdallah, B., et al., 1996, *Hum Gene Ther* 7 (16):  
5 1947-1954
- Absolom, D. R., 1986, *Methods Enzymol* 132; 281-318
- Abuchowski et al, 1984, *Cancer Biochem. Biophys* 7: 175
- Allen et al, 1991, *Biochim Biophys Acta* 1066: 29
- Beauchamp et al, 1983, *Anal. Biochem* 131: 25
- 10 Bloom, H., Beier, H., Gross, H.S., 1987,  
*Electrophoresis* 8: 93-99
- Blume et al, 1990, *Biochim Biophys. Acta* 1029, 91-7
- Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M.  
D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P., 1995,  
15 *Proc Natl Acad Sci USA* 92; 7297-301
- Boussif, O, et al., 1996, *Gene Ther* 3 (12): 1074-1080
- Chamow et al, 1994, *Bioconjugate Chem.*, 5: 133
- Chonn, A.; Cullis, P. R.; Devine, D. V., 1991, *J Immunol*  
146; 4234-41
- 20 Chonn, A.; Semple, S. C.; Cullis, P. R., 1992, *J Biol*  
*Chem* 267; 18759-65
- Delgado et al, 1990, *Biotech. Appl. Biochem.*, 12: 119
- Dust et al, 1990, *Macromolecules*, 23:119
- Elling et al, 1991, *Biotech. Appl. Biochem.* 13: 354
- 25 Harris, J.M., et al., 1989, *Polymer Preprints* 30 (2):  
356
- Hodgson, C. P., 1995, *Biotechnology* 13; 222-5.
- Joppich et al, 1979, *Macromol. Chem.*, 180: 408

- Kircheis, R.; Kichler, A.; Wallner, G.; Kursa, M.;  
Ogris, M.; Felzmann, T.; Buchberger, M.; Wagner, E.,  
1997, *Gene Therapy* 4; 409-18
- Kirpotin, et al., 1997, *Biochemistry* 36, 66-75
- 5 Klibanov et al, 1990, *FEBS Letters* 268: 235
- Klibanov et al, 1991, *Biochem. Biophys. Acta*, 1062: 142
- Mayhew et al, 1992, *Int. J. Cancer* 51, 1-8
- Miller, J., et al., 1991, *J Coll Int Sci* 143(2)
- Moghim, S. M.; Muir, I. S.; Iillum, L.; Davis, S. S.;  
10 Kolb Bachofen, V., 1993, *Biochim Biophys Acta* 1179;  
157-65
- Mori, A.; Klibanov, A. L.; Torchilin, V. P.; Huang, L.,  
1991, *FEBS Lett* 284; 263-6
- Nakamura, A., et al., 1986, *J Biol. Chem* 261:16792
- 15 Nilsson et al, 1984, *Methods Enzymol.*, 104: 56
- Papahadjopoulos et al, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
88, 11460-4
- Pita et al, 1970, *Eur. J. Biochem.* 94: 11
- Plank, C., et al., 1992, *Bioconjugate Chemistry* 3(6):  
20 533-539
- Plank, C.; Mechtler, K.; Szoka, F. J.; Wagner, E., 1996,  
*Hum Gene Ther* 7: 1437-1446
- Roitt, I. M.; Brostoff, J., 1991, Male, C. K.:Kurzes  
Lehrbuch der Immunologie; Thieme Verlag, 2. Auflage
- 25 Sarin et al, 1981, *Anal. Biochem.* 117, 147-57
- Sambrook, J., et al., 1989, *Molecular Cloning: A  
Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor,  
New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Senior, J.; Delgado, C.; Fisher, D.; Tilcock, C.;  
30 Gregoriadis, G., 1991, *Biochim Biophys Acta* 1062;  
77-82

- Stryer, 1990, *Biochemie*, Kapitel 31, Verlag Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg
- Torchilin, V. P.; Klibanov, A. L.; Huang, L.; S, O. D.; Nossiff, N. D.; Khaw, B. A., 1992, *Faseb J* 6; 2716-9
- 5 Torchilin, V. P., et al., 1994, *Biochim Biophys Acta* 1195, , 181-184
- Torchilin, V. P., und Papisov, M. I., 1994, *J Liposome Res* 4(1), , 725-739
- Wirth et al, 1991, *Bioorg. Chem.*, 19: 133
- 10 Woodle, M. C.; Newman, M. S.; Cohen, J. A., 1994, *J Drug Target* 2; 397-403
- Yoshinaga et al, 1989, *J. Bioactive Comp. Polym.*, 4: 17
- Yoshioka, 1991, *Biomaterials* 12, 861-4
- 15 Zalipsky, S. und Barany, G., 1990, *J Bioact Compatible Polym* 5: 227
- Zalipsky, S., 1993, *Bioconjugate Chemistry* 4, 296-299
- Zalipsky, S., et al., 1997, *Bioconjugate Chemistry* 8, 111-118



## Patentansprüche

- 5 1. Komplexe aus Nukleinsäure und Polyethylenimin (PEI),  
dadurch gekennzeichnet, daß das PEI mit einem daran  
kovalent gekoppelten hydrophilen Polymeren  
modifiziert ist.
- 10 2. Komplexe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nukleinsäure DNA ist und das Verhältnis DNA  
zu PEI, ausgedrückt durch das molare Verhältnis der  
Stickstoffatome im PEI zu den Phosphatatomen in der  
DNA (N/P-Wert) etwa 0.5 bis etwa 100 beträgt.
- 15 3. Komplexe nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,  
daß der N/P-Wert etwa 2 bis etwa 20 beträgt.
4. Komplexe nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,  
daß der N/P-Wert etwa 3 bis etwa 10 beträgt.
- 20 5. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, daß das PEI ein  
Molekulargewicht von etwa 700 D bis etwa 2000000 D  
aufweist.
6. Komplexe nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet,  
daß das PEI ein Molekulargewicht von etwa 2000 D bis  
etwa 800000 D aufweist.
- 25 7. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, daß das hydrophile Polymer  
linear ist.

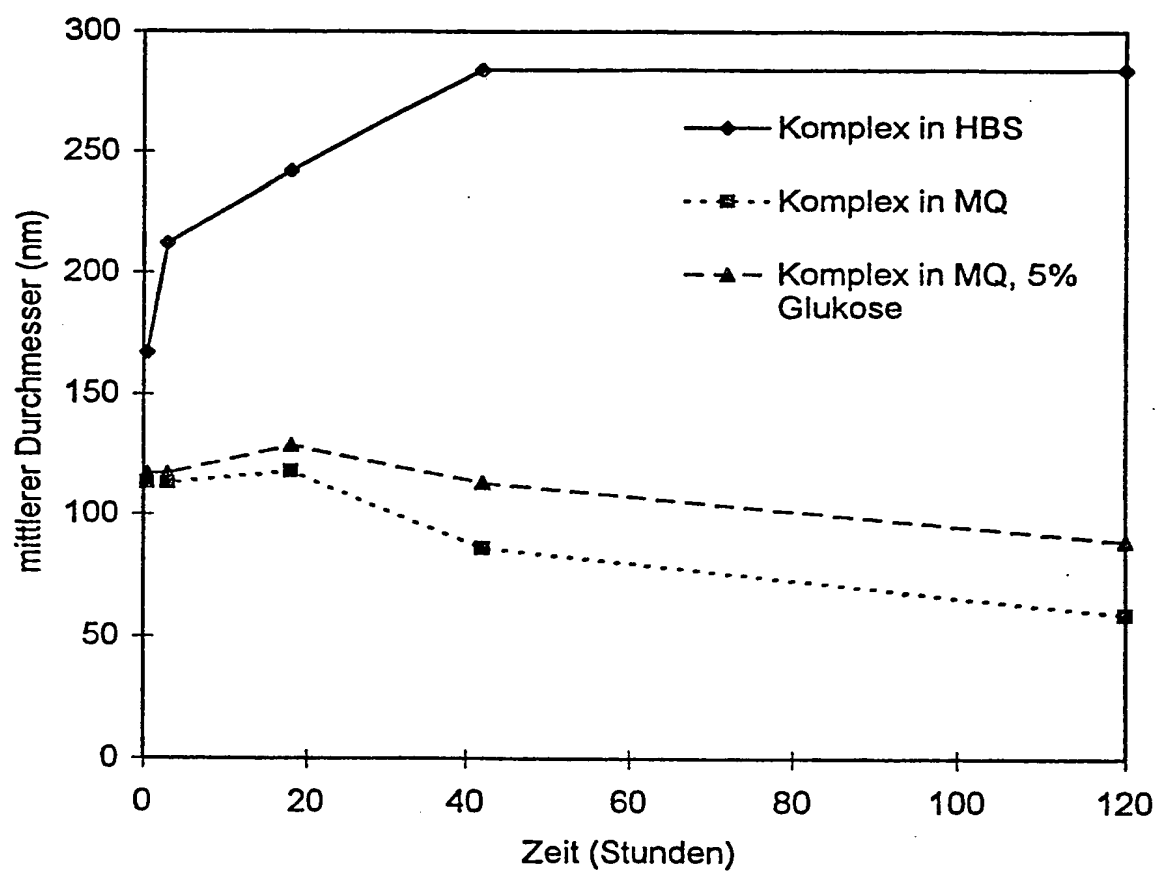
8. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das hydrophile Polymer ausgewählt ist aus der Gruppe Polyethylenglykole (PEG), Polyvinylpyrrolidone, Polyacrylamide,  
5 Polyvinylalkohole, oder Copolymeren davon.
9. Komplexe nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das hydrophile Polymer PEG ist.
10. Komplexe nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Molekulargewicht des hydrophilen Polymeren etwa 500 D bis etwa 20000 D beträgt.
11. Komplexe nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Molekulargewicht des hydrophilen Polymeren etwa 1000 D bis etwa 10000 D beträgt.
- 15 12. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis Polymer: primäre Aminogruppen/PEI etwa 1:10 bis etwa 10:1 beträgt.
- 20 13. Komplexe nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis etwa 1:5 bis etwa 5:1 beträgt.
14. Komplexe nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis etwa 1:3 bis etwa 1:1 beträgt.
- 25 15. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß PEI mit einem zellulären Liganden modifiziert ist.
16. Komplexe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand Transferrin ist.
17. Komplexe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand EGF ist.

18. Komplexe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß PEI mit dem Liganden über das hydrophile Polymere verbunden ist.
19. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Nukleinsäure  
5 eine therapeutisch wirksame Nukleinsäure enthalten.
20. Komplexe nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die therapeutisch wirksame Nukleinsäure für ein oder mehrere Zytokine kodiert.
- 10 21. Komplexe nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die therapeutisch wirksame Nukleinsäure für ein oder mehrere Tumorantigene oder Fragmente davon kodiert.
22. Komplexe nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die therapeutisch wirksame Nukleinsäure ein  
15 Selbstmordgen ist.
23. Komplexe nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Selbstmordgen das Herpes Simplex Thymidinkinasegen ist.
- 20 24. Verfahren zur Herstellung von Komplexen nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß  
zuerst DNA und, gegebenenfalls mit einem zellulären  
Liganden modifiziertes, PEI durch Mischen der  
verdünnten Lösungen komplexiert und anschließend das  
25 hydrophile Polymere an PEI gebunden wird.
25. Verfahren nach Anspruch 24, daß die DNA-Konzentration etwa 5 bis 50 µg DNA/ml beträgt.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Konzentration etwa 10 bis 40 µg DNA/ml beträgt.
- 5 27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Komplexierung bei einer Salzkonzentration unterhalb des physiologischen Werts durchgeführt wird.
- 10 28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Komplexierung in entionisiertem Wasser durchgeführt wird.
- 15 29. Verfahren zur Herstellung nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß im Anschluß an die Komplexierung von DNA und, gegebenenfalls modifiziertem, PEI die Komplexe aus der verdünnten Lösung auf eine Konzentration von etwa 200 µg/ml bis 1 mg/ml, bezogen auf DNA, gebracht werden.
- 20 30. Zusammensetzung für die Transfektion von Säugetierzellen, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehrere Komplexe nach einem der Ansprüche 1 bis 23 in einer Konzentration von 200 µg/ml bis 1 mg/ml, bezogen auf DNA, enthält.
31. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen oder mehrere Komplexe nach Anspruch 19.
- 25 32. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Komplexe in einer Konzentration von etwa 200 µg/ml bis etwa 1 mg/ml, bezogen auf DNA, enthält.
- 30 33. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Komplexe DNA enthalten, die für ein oder mehrere Zytokine kodiert.

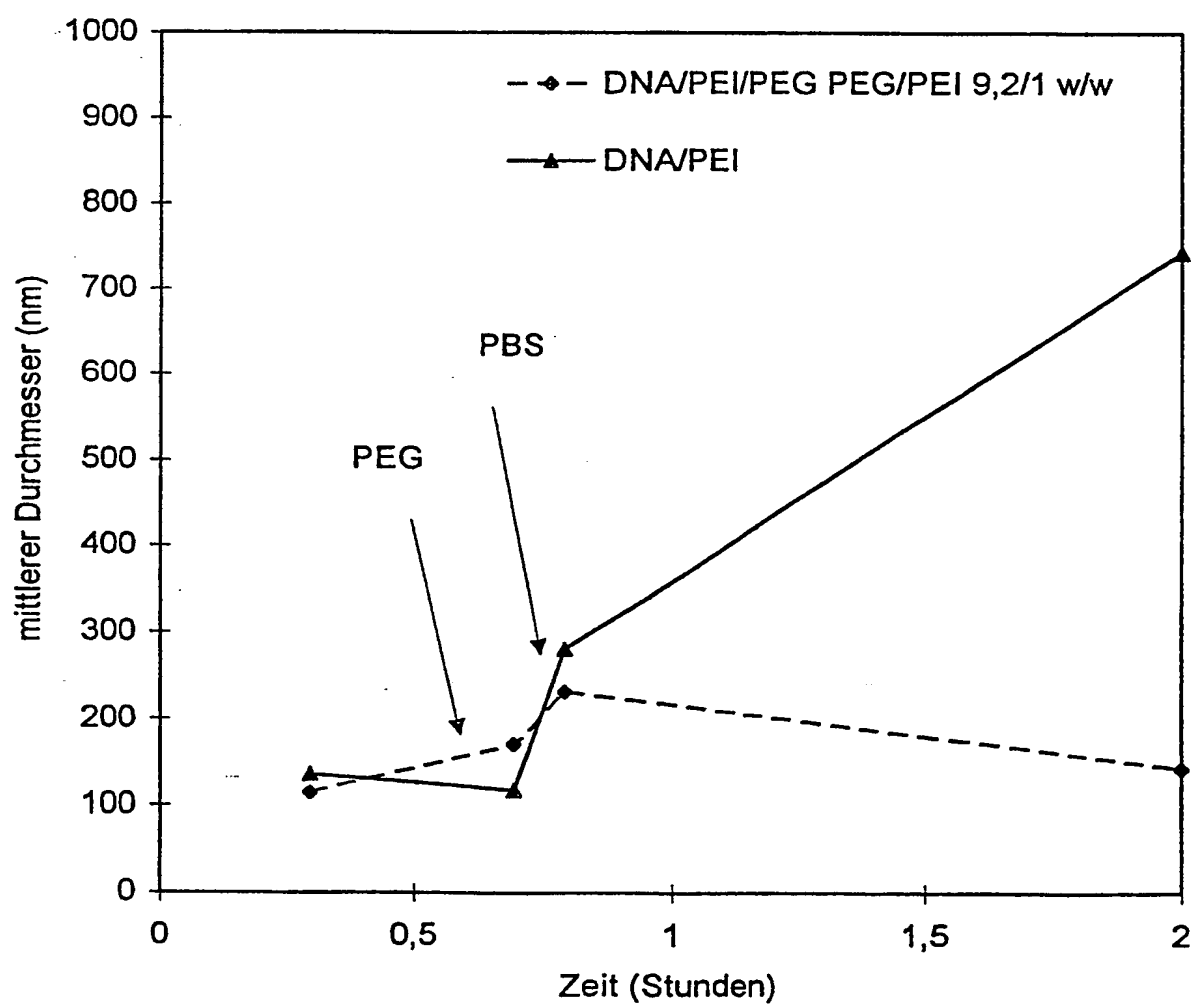
34. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 31  
oder 32 in Form einer Tumorstoffimpfung, dadurch  
gekennzeichnet, daß die Komplexe DNA enthalten, die  
5 für ein oder mehrere Tumorstoffantigene oder Fragmente  
davon kodiert, gegebenenfalls in Kombination mit  
DNA, die für ein oder mehrere Zytokine kodiert.

1/20  
Fig. 1



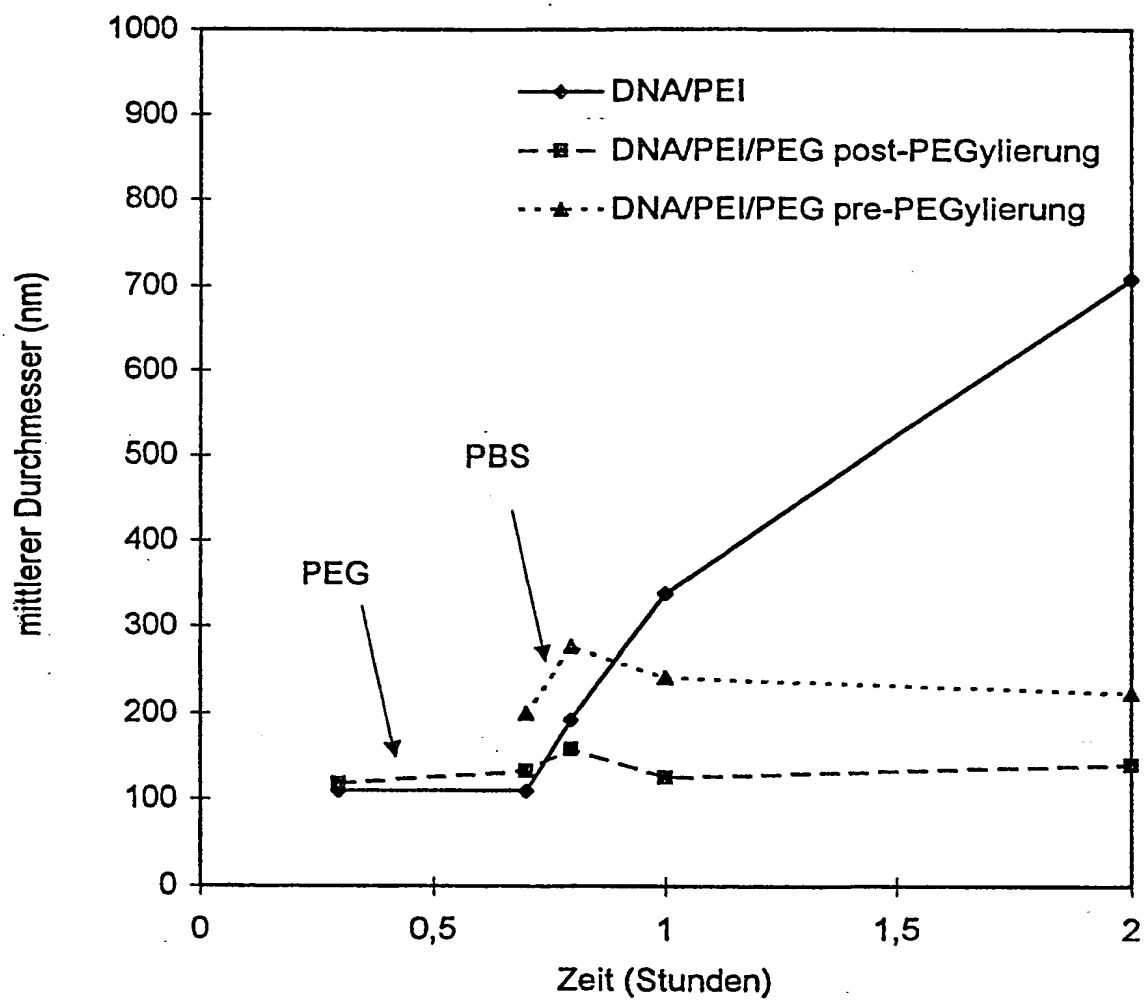
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/20  
Fig.2a



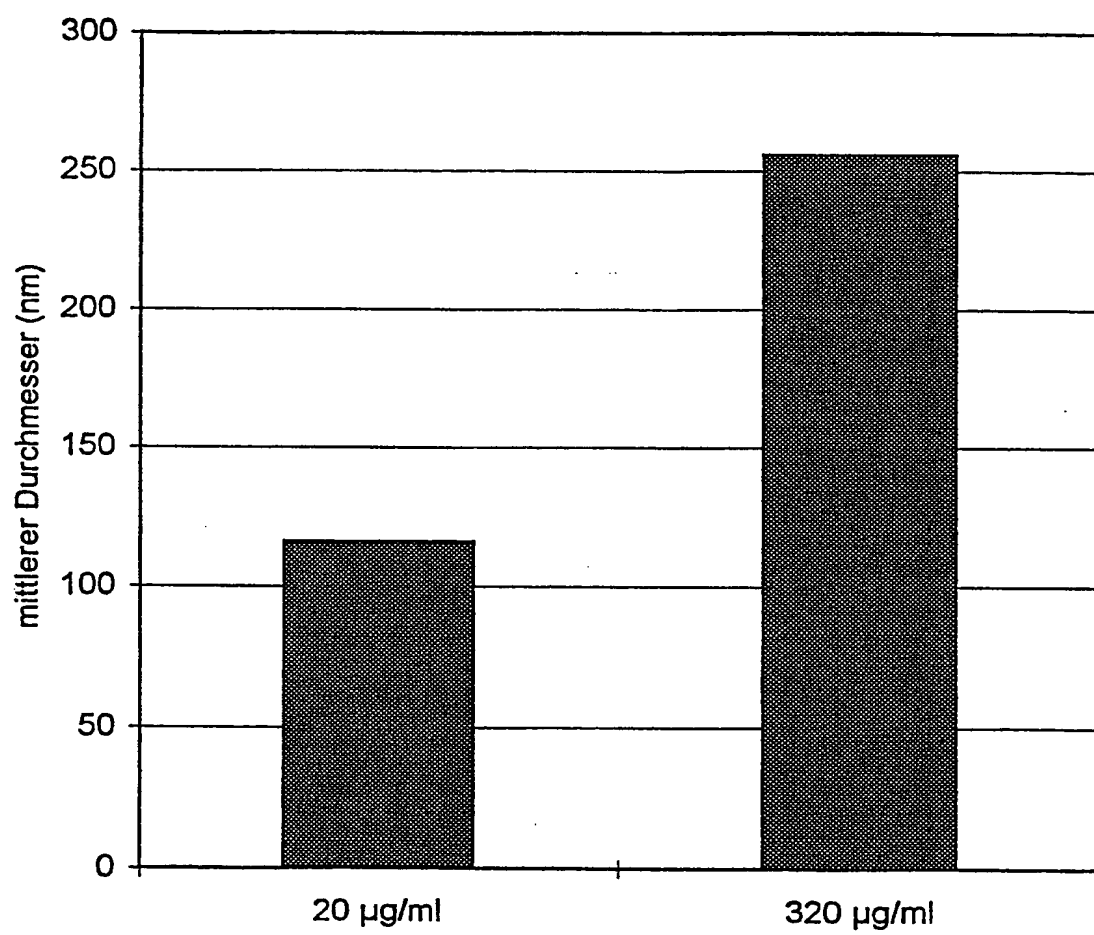
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/20  
Fig. 2b



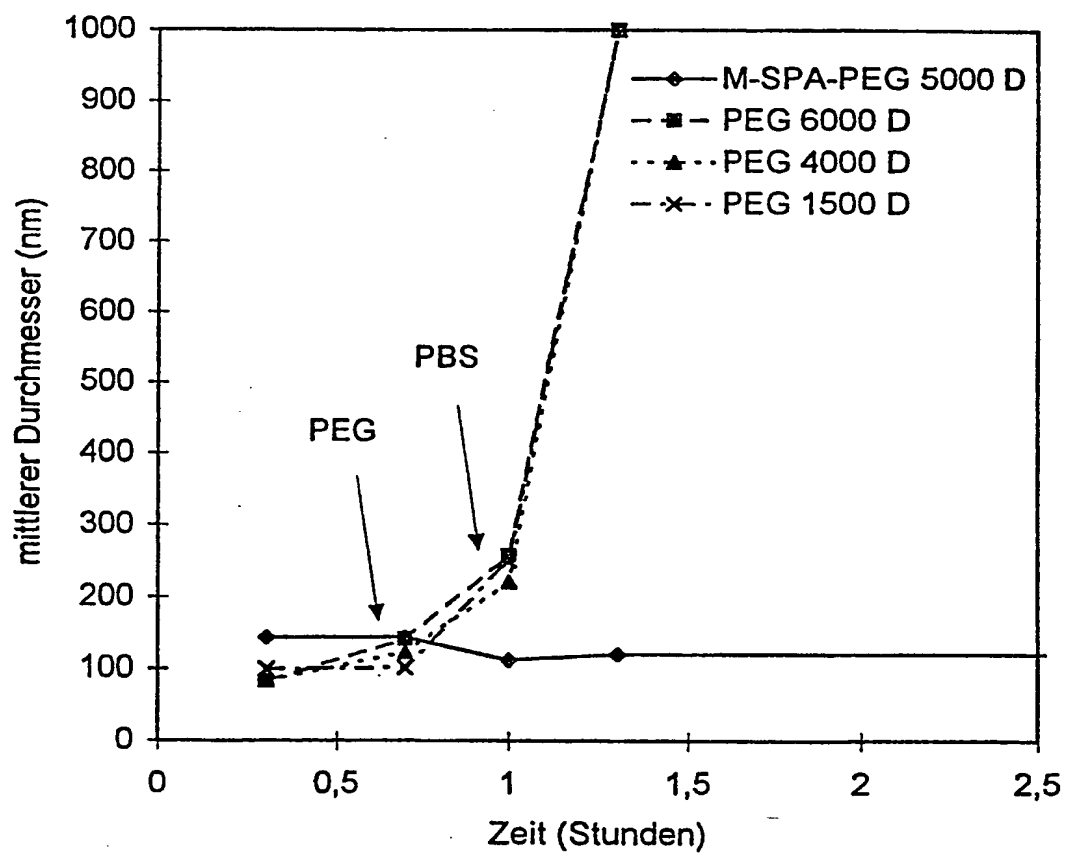
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/20  
Fig.2c



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

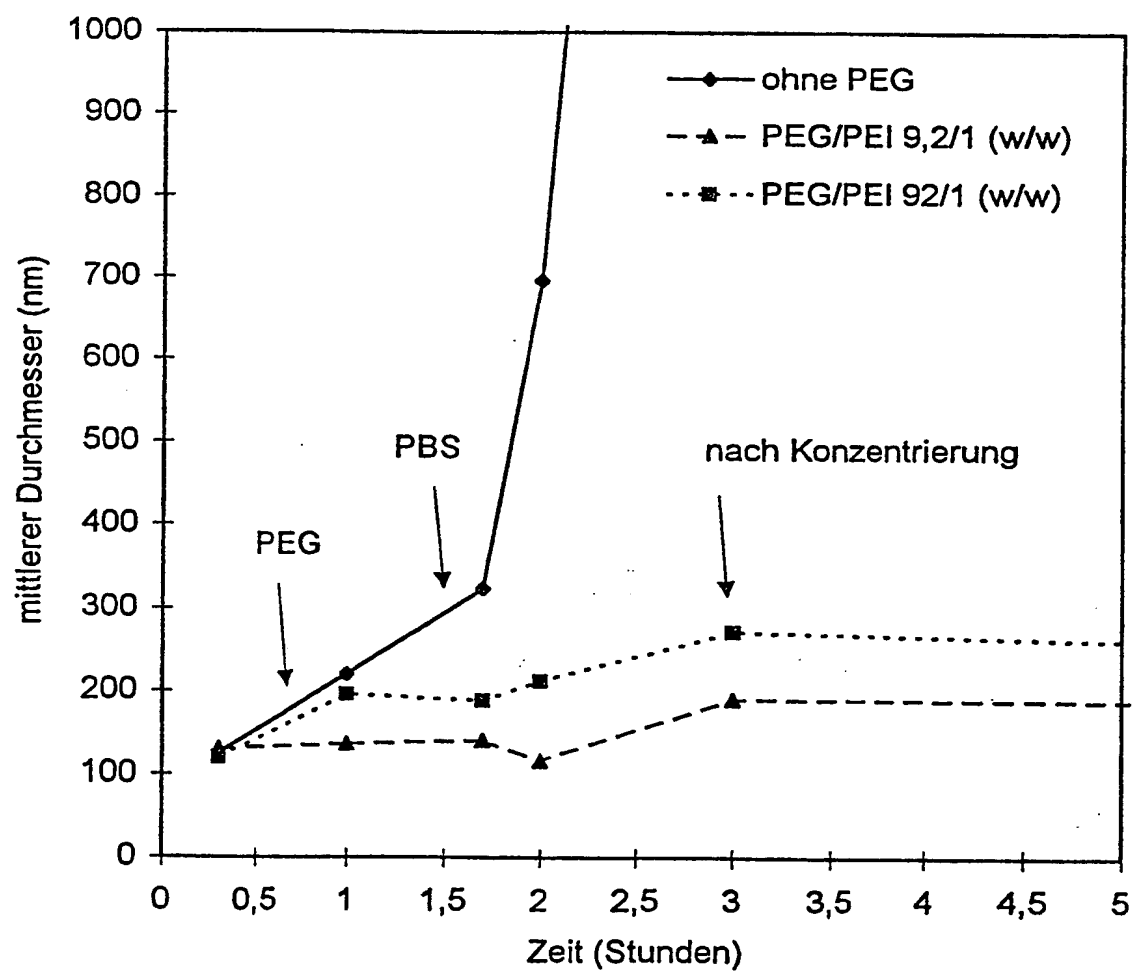
5/20  
Fig. 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/20

Fig. 4

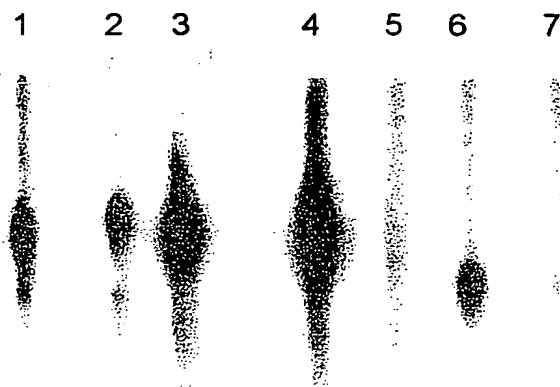


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

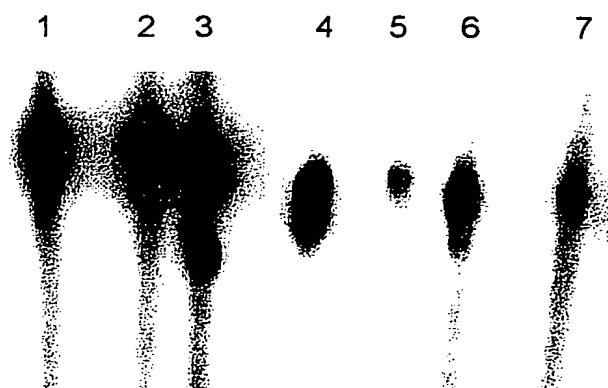
7/20

Fig. 5

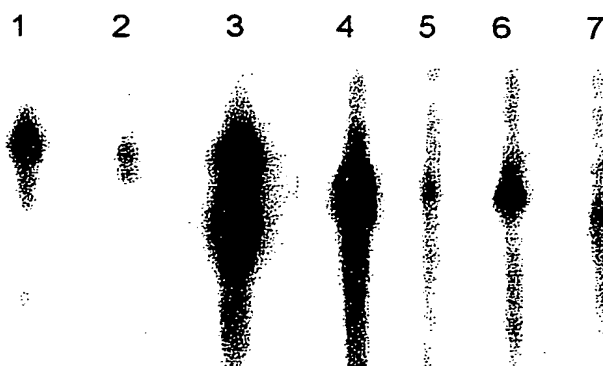
Complement C3



Fibrinogen

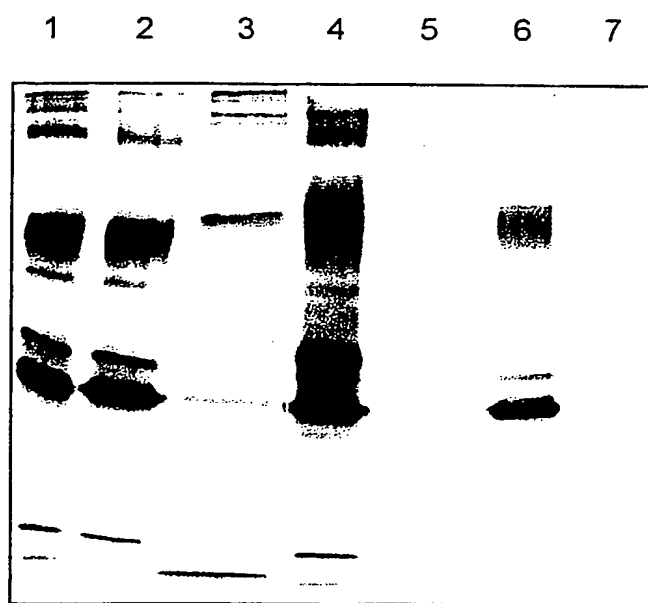


Fibronectin



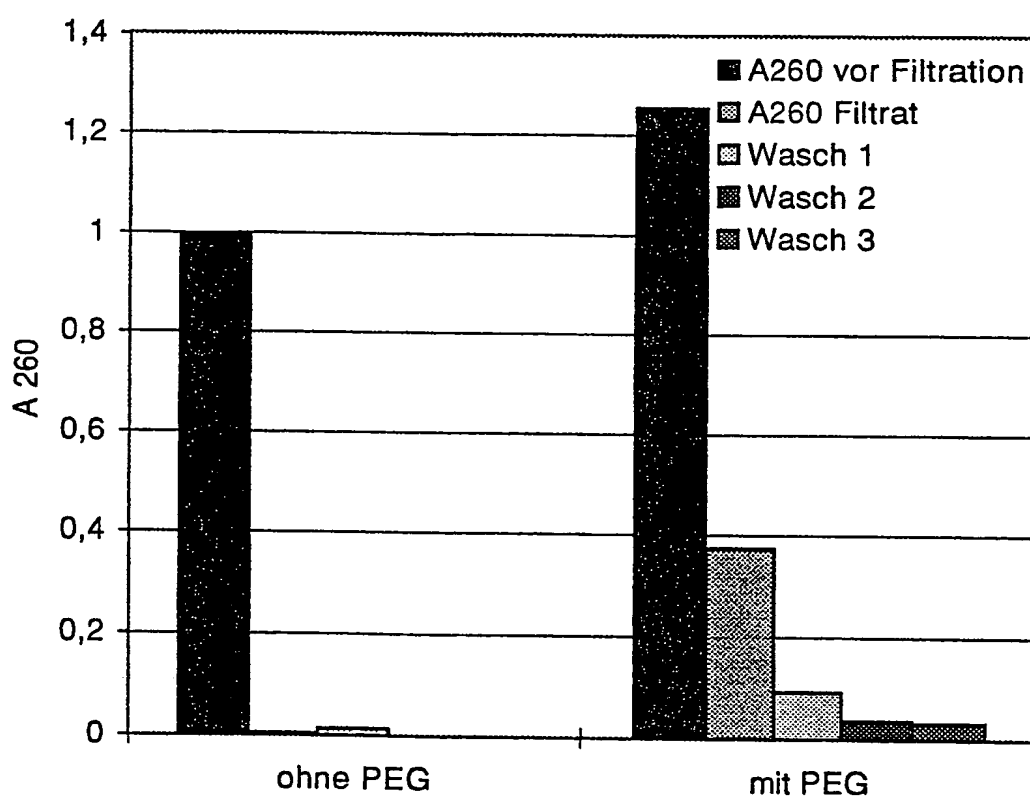
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8/20  
Fig. 6a

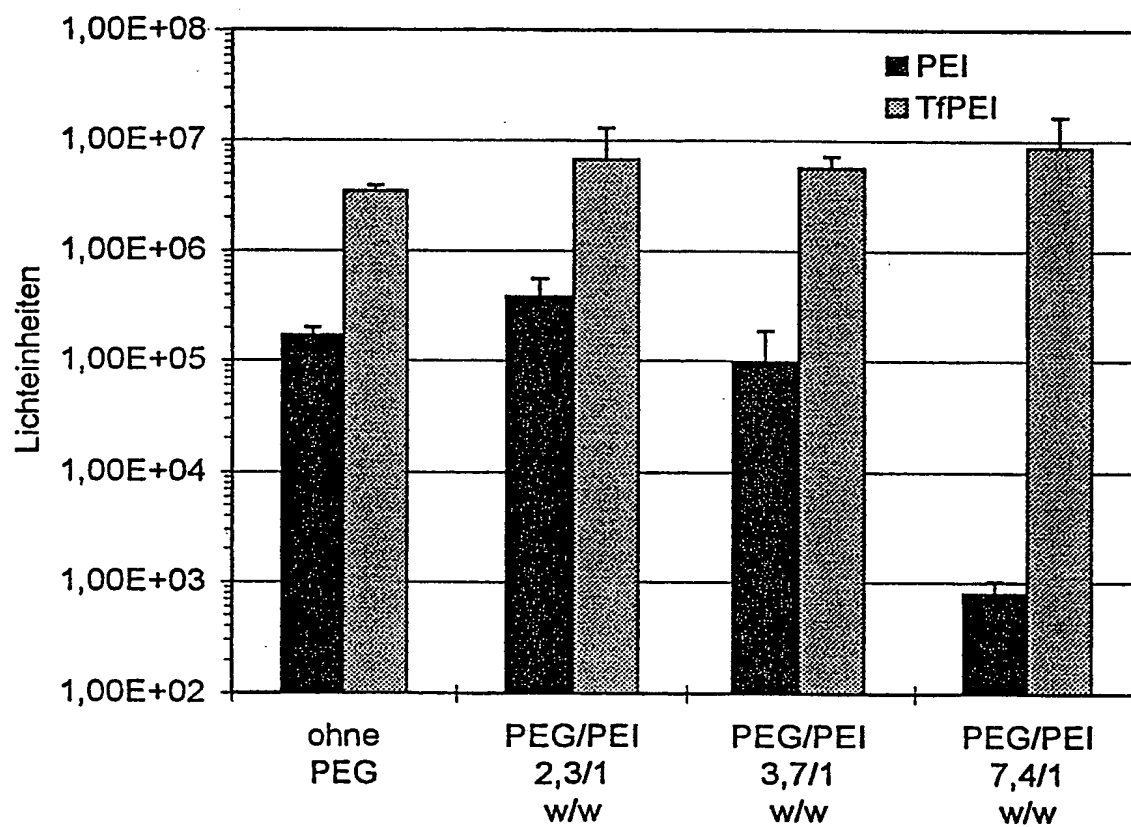


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

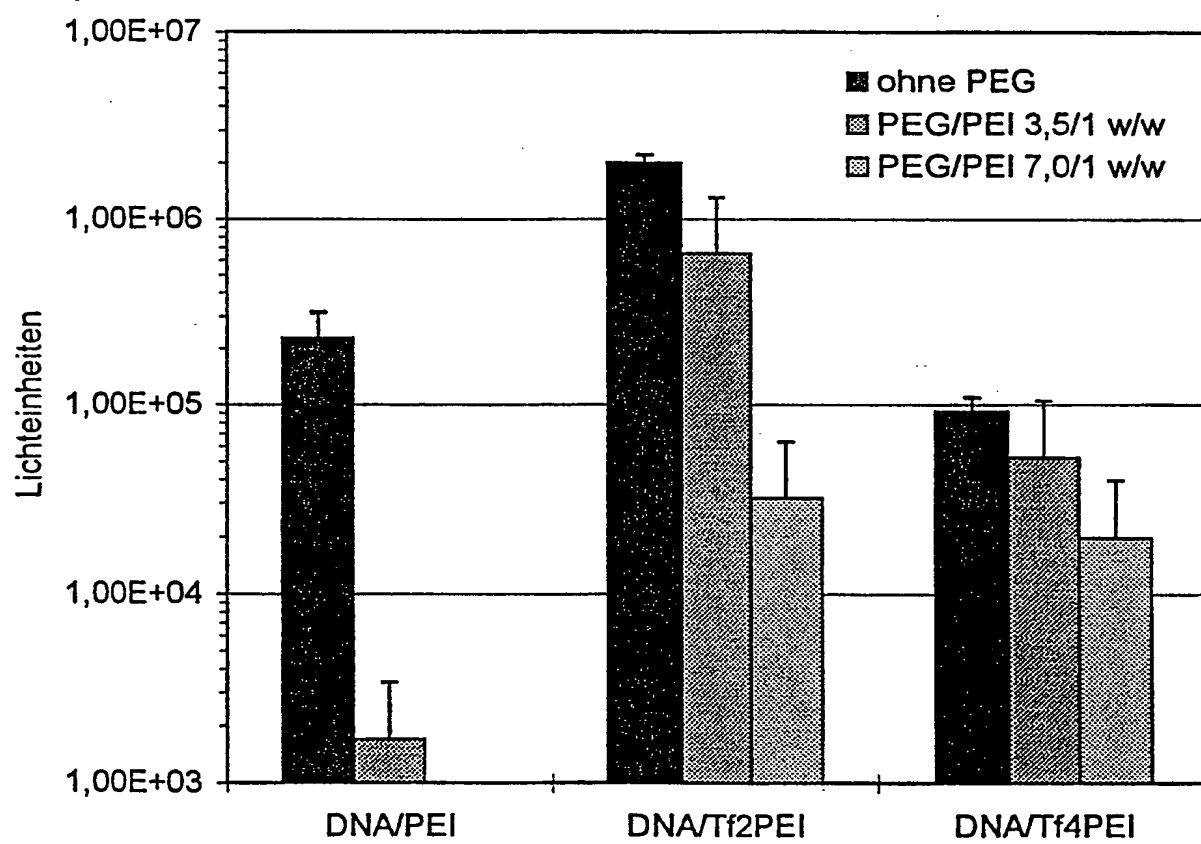
9/20  
Fig. 6b



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

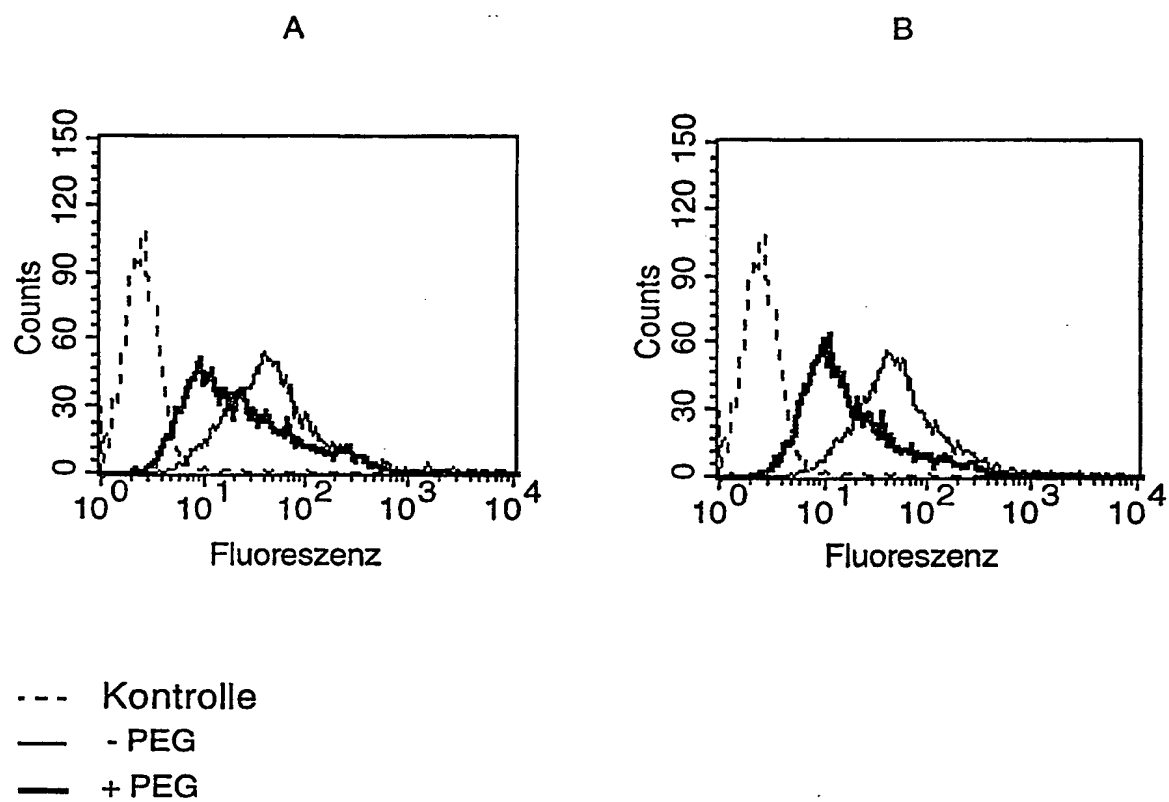
10/20  
Fig. 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/20  
Fig. 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

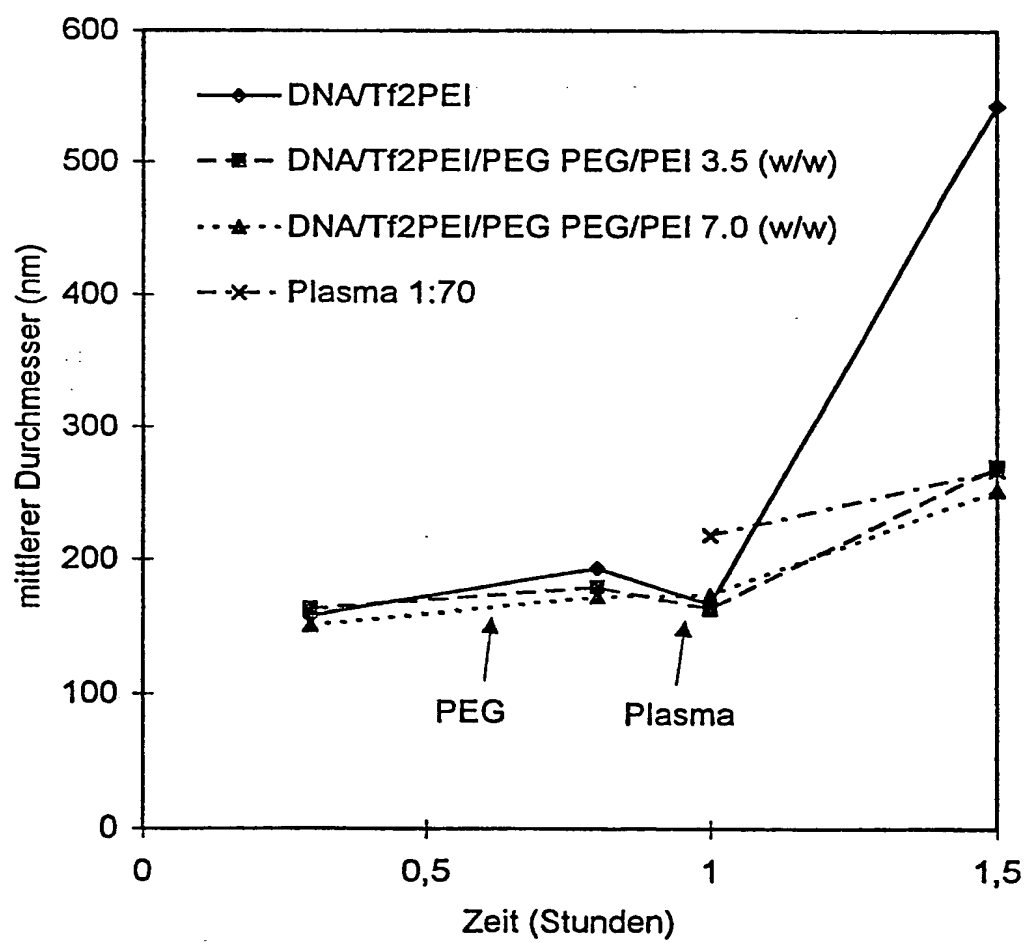
12/20  
Fig. 9



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

13/20

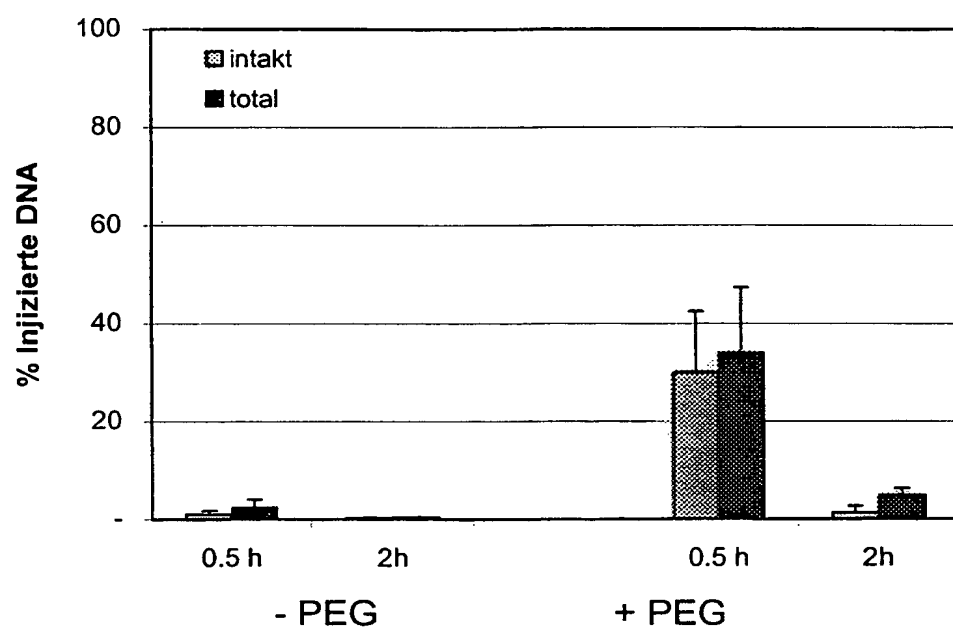
Fig. 10



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

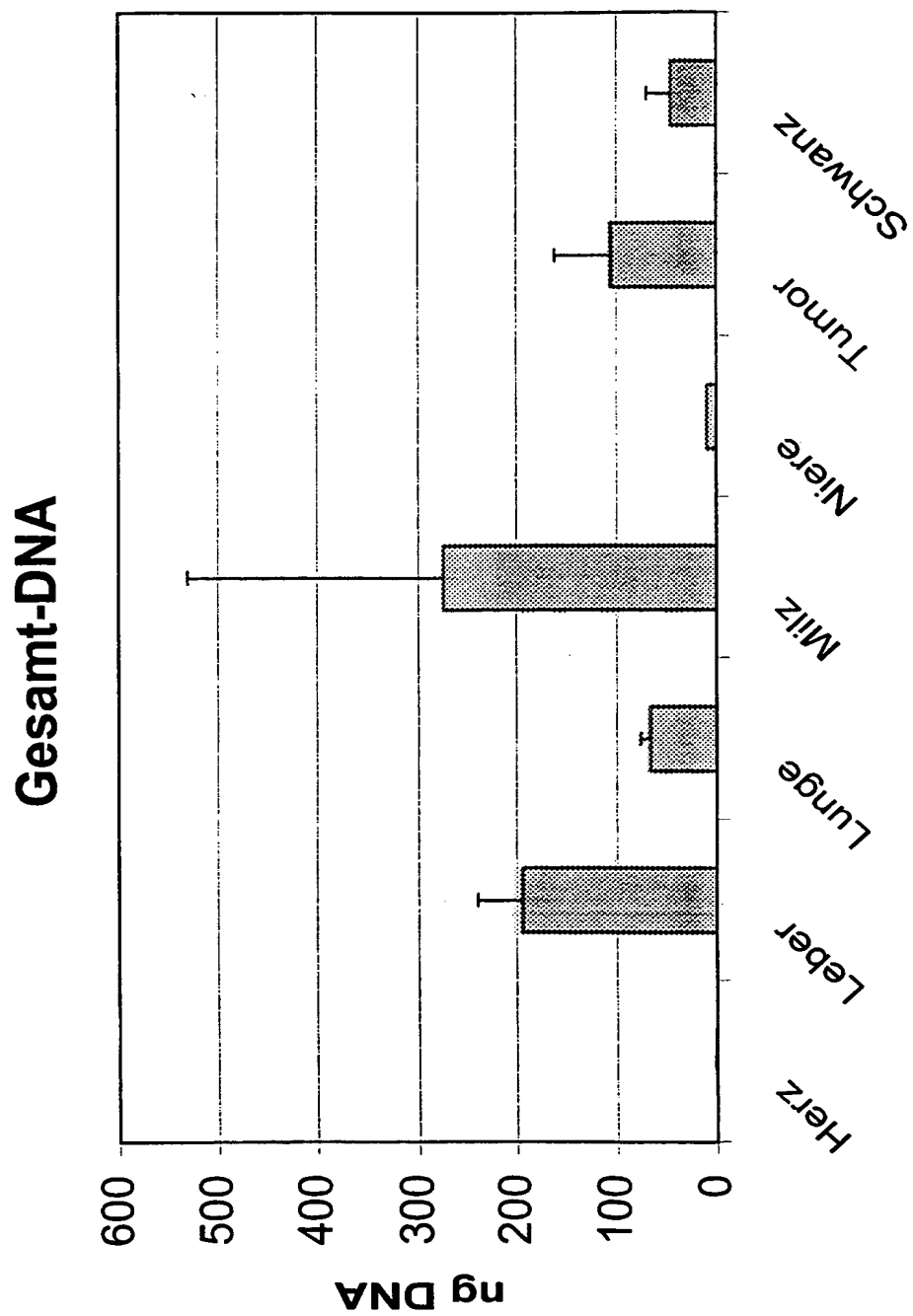
14/20

Fig. 11



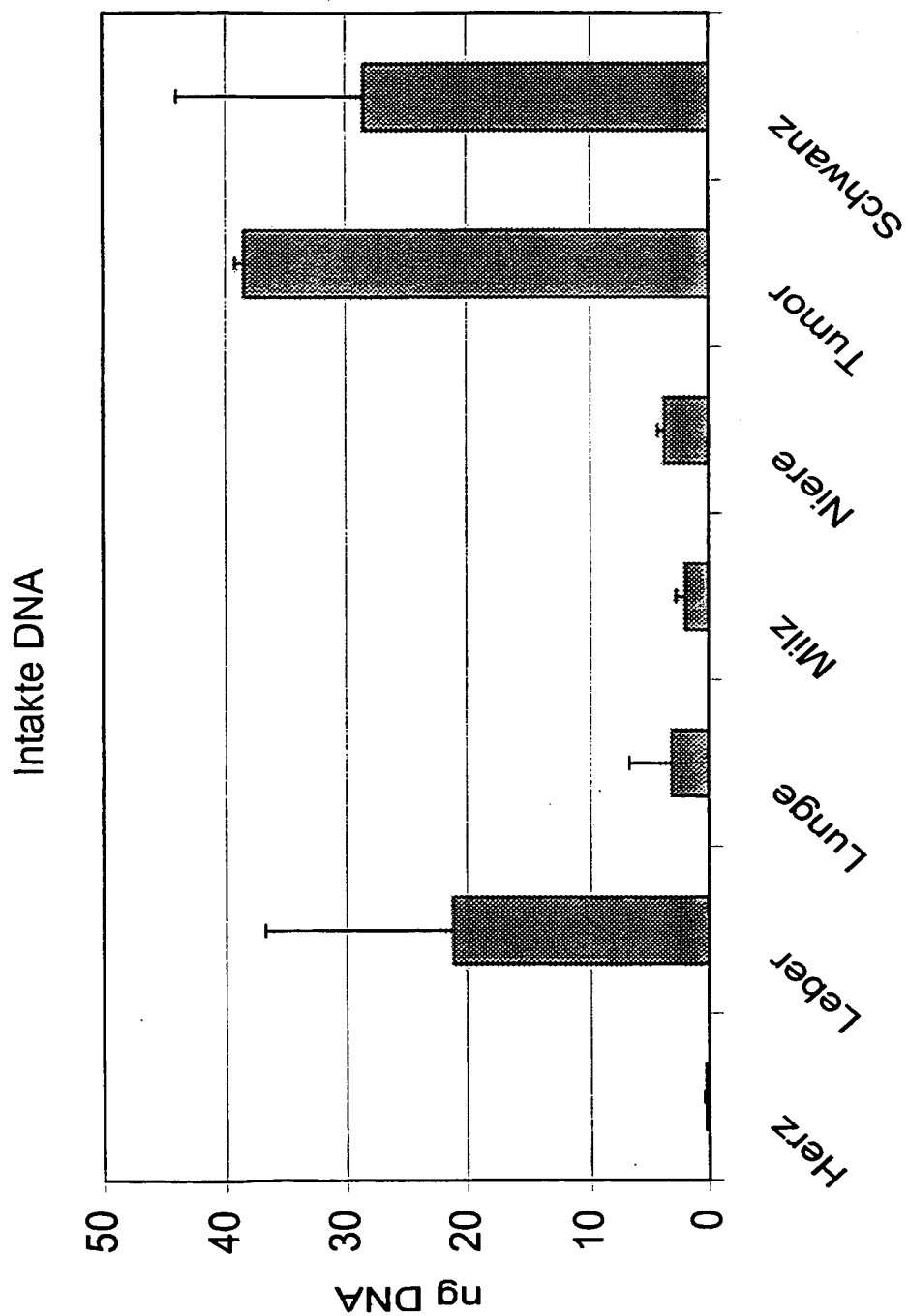
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

15/20  
Fig. 12a



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

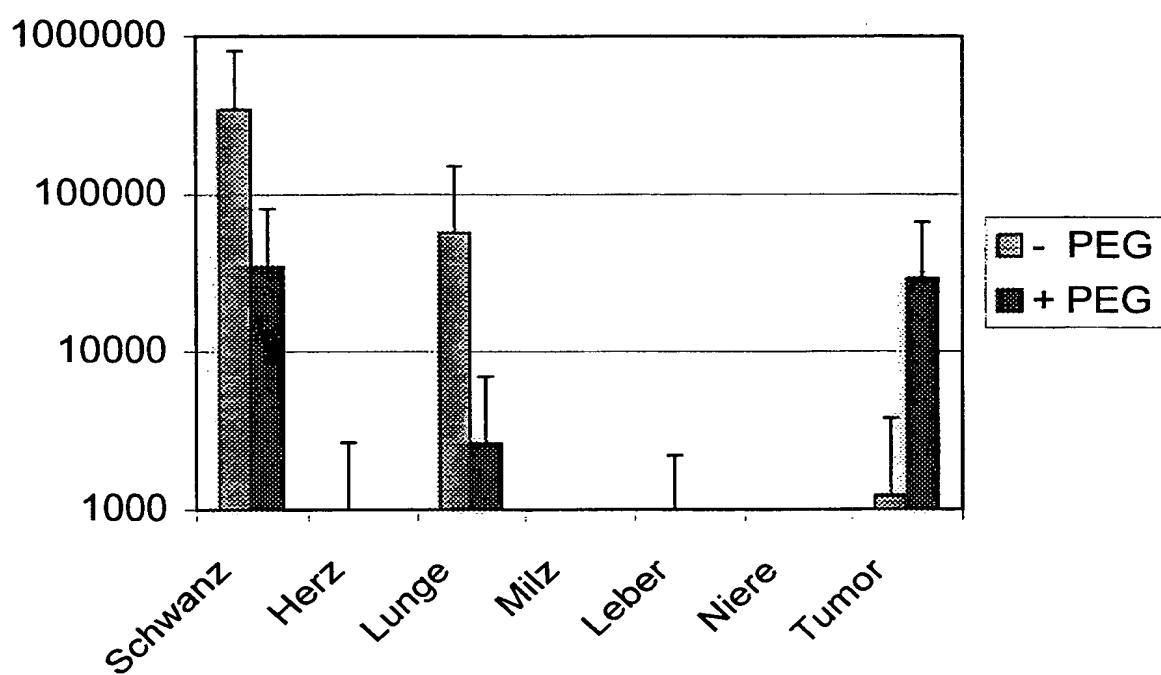
16/20  
Fig. 12b



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

17/20

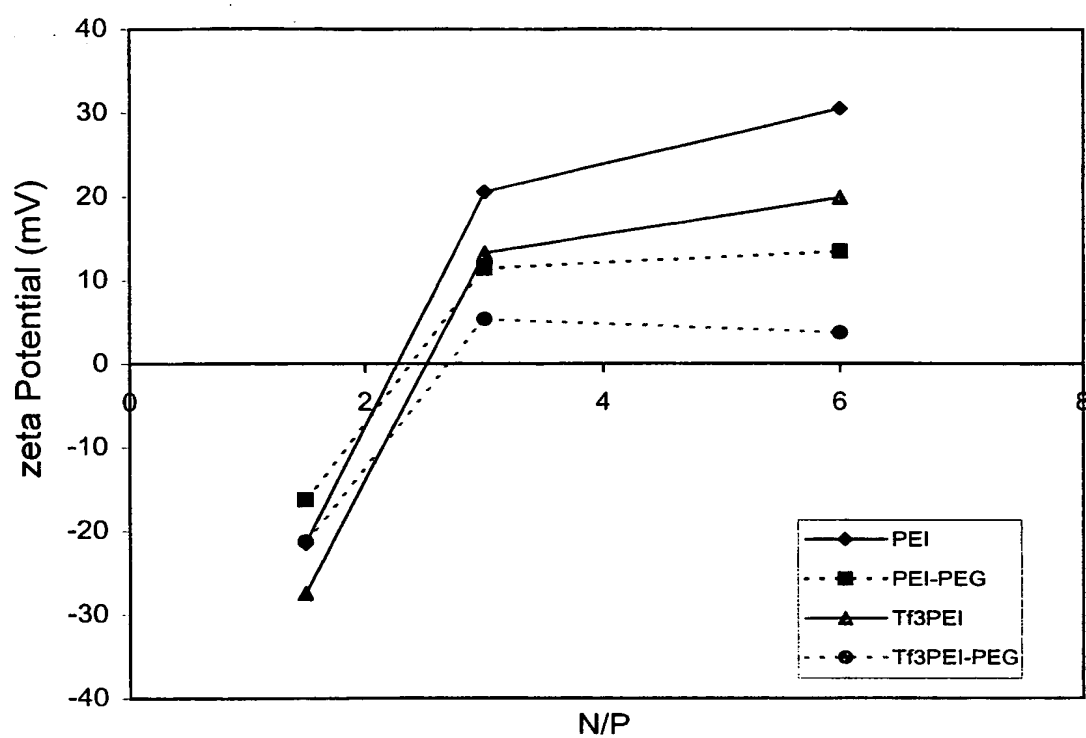
Fig. 13



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

18/20

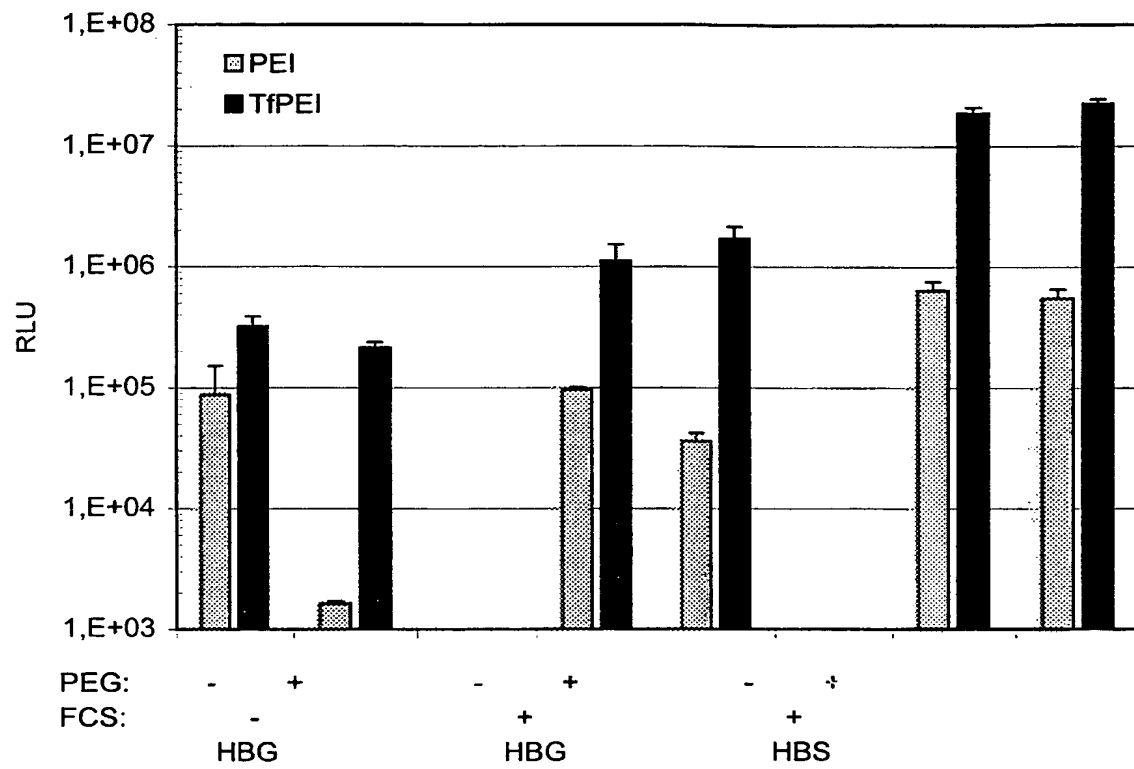
Fig. 14



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

19/20

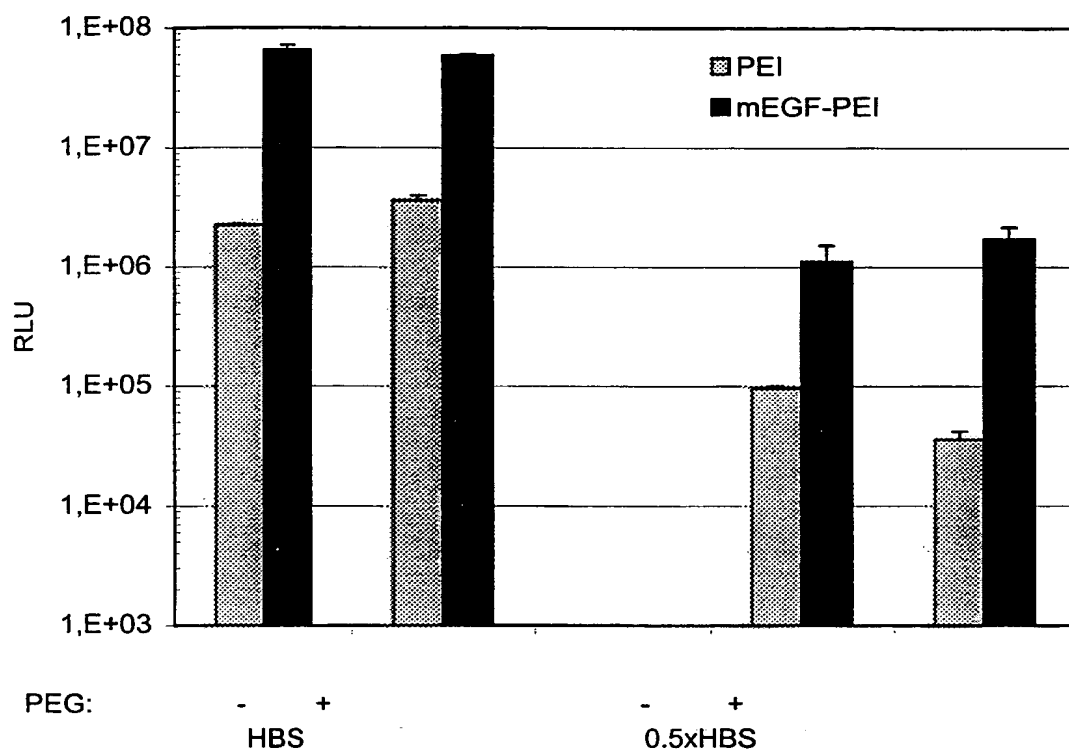
Fig. 15



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

20/20

Fig. 16



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/03679

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/87 C07K14/485 C07K14/79 C12N9/12 C07K14/52  
A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIRCHEIS, R. ET AL.: "Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery." GENE THERAPY, vol. 4, 1997, pages 409-18, XP002081698 cited in the application see the whole document	1-34
Y	PLANK C ET AL: "ACTIVATION OF THE COMPLEMENT SYSTEM BY SYNTHETIC DNA COMPLEXES: A POTENTIAL BARRIER FOR INTRAVENOUS GENE DELIVERY" HUMAN GENE THERAPY, vol. 7, no. 12, 1 August 1996, pages 1437-1446, XP000619665 cited in the application see the whole document	1-34

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 October 1998

Date of mailing of the international search report

04/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Smalt, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal : Application No

PCT/EP 98/03679

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 21036 A (VIAGENE INC) 11 July 1996 see the whole document, in particular claims 1,2, and 6, page 7, lines 29-30, page 27 - Line 34-36, page 28- Lines 13-14 and example 4 ---	1-34
A	FR 2 362 156 A (PHARMACIA AB) 17 March 1978 see the whole document, in particular claims 1-3 ---	8
A	WO 95 28494 A (TARGETED GENETICS CORP ;OVERELL ROBERT W (US); WEISSER KAREN E (US) 26 October 1995 see the whole document -----	18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No

PCT/EP 98/03679

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9621036	A	11-07-1996	AU	4690596 A	24-07-1996
<hr/>					
FR 2362156	A	17-03-1978	GB	1578348 A	05-11-1980
			AT	359637 B	25-11-1980
			AT	592477 A	15-04-1980
			AU	520366 B	28-01-1982
			AU	2794277 A	22-02-1979
			BE	857869 A	17-02-1978
			CA	1091153 A	09-12-1980
			CH	641681 A	15-03-1984
			DE	2736223 A	23-02-1978
			DK	364277 A, B,	18-02-1978
			JP	1016812 B	27-03-1989
			JP	1537301 C	21-12-1989
			JP	53024033 A	06-03-1978
			NL	7709025 A	21-02-1978
			SE	448147 B	26-01-1987
			SE	7709233 A	18-02-1978
			US	4261973 A	14-04-1981
<hr/>					
WO 9528494	A	26-10-1995	AU	2387295 A	10-11-1995
			CA	2187818 A	26-10-1995
			EP	0753069 A	15-01-1997
			JP	10501963 T	24-02-1998
<hr/>					

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internat. es Aktenzeichen

PCT/EP 98/03679

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/87 C07K14/485 C07K14/79 C12N9/12 C07K14/52  
A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KIRCHEIS, R. ET AL.: "Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery." GENE THERAPY, Bd. 4, 1997, Seiten 409-18, XP002081698 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-34
Y	PLANK C ET AL: "ACTIVATION OF THE COMPLEMENT SYSTEM BY SYNTHETIC DNA COMPLEXES: A POTENTIAL BARRIER FOR INTRAVENOUS GENE DELIVERY" HUMAN GENE THERAPY, Bd. 7, Nr. 12, 1. August 1996, Seiten 1437-1446, XP000619665 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-34

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Oktober 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/11/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 21036 A (VIAGENE INC) 11. Juli 1996 siehe das ganze Dokument, insbesondere die Ansprüche 1,2, und 6, Seite 7 - Zeile 29-30, Seite 27 - Zeile 34-36, Seite 28 - Zeile 13-14, und Beispiel 4. ----	1-34
A	FR 2 362 156 A (PHARMACIA AB) 17. März 1978 siehe das ganze Dokument, insbesondere die Ansprüche 1-3 ----	8
A	WO 95 28494 A (TARGETED GENETICS CORP ;OVERELL ROBERT W (US); WEISSER KAREN E (US) 26. Oktober 1995 siehe das ganze Dokument -----	18

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat: 35 Aktenzeichen

PCT/EP 98/03679

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9621036	A	11-07-1996	AU	4690596 A	24-07-1996
FR 2362156	A	17-03-1978	GB	1578348 A	05-11-1980
			AT	359637 B	25-11-1980
			AT	592477 A	15-04-1980
			AU	520366 B	28-01-1982
			AU	2794277 A	22-02-1979
			BE	857869 A	17-02-1978
			CA	1091153 A	09-12-1980
			CH	641681 A	15-03-1984
			DE	2736223 A	23-02-1978
			DK	364277 A, B,	18-02-1978
			JP	1016812 B	27-03-1989
			JP	1537301 C	21-12-1989
			JP	53024033 A	06-03-1978
			NL	7709025 A	21-02-1978
			SE	448147 B	26-01-1987
			SE	7709233 A	18-02-1978
			US	4261973 A	14-04-1981
WO 9528494	A	26-10-1995	AU	2387295 A	10-11-1995
			CA	2187818 A	26-10-1995
			EP	0753069 A	15-01-1997
			JP	10501963 T	24-02-1998

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 23 SEP 1999



WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 12/191 PCT	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/03679	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18/06/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 20/06/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/87		
Anmelder BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit von der Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  16/12/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  17.09.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Stolz, B  Tel. Nr. +49 89 2399 8416  

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**I. Grundlag d s Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-43                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-34                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/20-20/20              ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,        Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-34
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-34
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-34
	Nein: Ansprüch	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2. Unterlagen und Erklärungen

**siehe Beiblatt**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1. Begründete Stellungnahme

1.1. Die Anmeldung beschreibt für den Gentransfer geeignete Komplexe, bestehend aus Nukleinsäure und Polyethylenimin, welches mit einem hydrophilen Polymer kovalent modifiziert ist. Des weiteren können spezifische Liganden an die Komplexe gekoppelt sein. Beispielhaft ausgeführt ist die Modifizierung mit Polyethylenglykol (PEG) und gegebenenfalls mit Transferrin. Die Ansprüche beziehen sich auf die Komplexe selbst, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie pharmazeutische Zusammensetzungen.

1.2. Neuheit (Art. 33(2) PCT)

Mit einem hydrophilen Polymeren modifizierte Komplexe aus Polyethylenimin und DNS sind im Stand der Technik nicht beschrieben. Daher sind die Ansprüche 1 bis 34 neu.

1.3. Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

Die Anmeldung selbst beschreibt PEGylierung von Partikeln als eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Verhinderung der Opsonisierung (S. 3/4). Im zitierten Stand der Technik ist die Modifikation von Kondensierungsagenzien mit PEG zur Verbesserung der Verweildauer im Blut bzw. zur Vermeidung der vorzeitigen Elimination durch das Immunsystem beschrieben (WO96/21036 (D1); Plank et al., 1996 (D2)). D1 schlägt zur Lösung dieses Problems generell die PEGylierung von polykationischen Agenzien vor (S. 2, S. 7) und weist ausdrücklich darauf hin, dass diese Lösung für alle möglichen Polykationen taugt (S. 8, Zeilen 6-8). In D2 wird die Aktivierung des Komplementsystems durch verschiedene Polykationen (u.a. auch Polyethylenimin) in Abhängigkeit vom Ladungsverhältnis Polykation/DNS beschrieben. Bei Polylysin erfolgte nach PEGylierung eine Reduktion dieser Aktivierung.

Nach dem Stand der Technik besteht das der Anmeldung zugrunde liegende technische Problem in der Bereitstellung von alternativen, zum Gentransfer geeigneten Komplexen. Die von den Anmeldern vorgeschlagene Modifikation von Polyethylenimin stellt angesichts des Standes der Technik (D1, D2) eine von

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

mehreren für den Fachmann denkbaren Lösungen dar. Sowohl in D1 als auch in D2 wird ein positiver Effekt durch PEGylierung beschrieben. Polyethylenimin ist eine der im Stand der Technik verwendeten Substanzen. Es handelt sich also bei der vorgeschlagenen Lösung um eine Auswahl aus mehreren für den Fachmann naheliegenden, die, um erfinderisch zu sein, mit einem unerwarteten Effekt gegenüber den bereits bekannten Lösungen einhergehen müsste. Da die vorliegenden Unterlagen dazu aber keine Angaben zu enthalten scheinen, kann die Frage nach erfinderischer Tätigkeit nicht bejaht werden.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10

Applicant's or agent's file reference 12/191 PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/03679	International filing date (day/month/year) 18 June 1998 (18.06.1998)	Priority date (day/month/year) 20 June 1997 (20.06.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/87, C07K 14/485, 14/79, C12N 9/12, C07K 14/52, A61K 31/70		
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 December 1998 (16.12.1998)	Date of completion of this report 17 September 1999 (17.09.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/03679

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-43, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-34, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/20-20/20, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.  
PCT/EP 98/03679

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 34	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 34	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 34	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. Reasoned statement

1.1. The application describes complexes suitable for gene transfer consisting of nucleic acid and polyethylenimine which is covalently modified by means of a hydrophilic polymer. Specific ligands may also be coupled to the complexes. Modification by means of polyethylene glycol (PEG) and optionally by means of transferrin is described by way of example. The claims relate to the complexes themselves and to methods for producing said complexes as well as to pharmaceutical compositions.

#### 1.2. Novelty (PCT Article 33(2))

Complexes of polyethylenimine and DNA which are modified by means of a hydrophilic polymer are not described in the prior art. Claims 1 to 34 are therefore novel.

#### 1.3. Inventive step

The application itself describes polyethylene glycolization of particles as being one of the most

.../...

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(Continuation of V.2)

frequently used methods for preventing opsonization (pages 3 and 4).

The modification of condensing agents by means of PEG to improve the retention time in blood or to prevent premature elimination by the immune system is described in the cited prior art (WO-A-96/21036 (D1); Plank et al., 1996 (D2)). D1 proposes as the solution to this problem the polyethylene glycolization of polycationic agents in general (page 2, page 7) and emphasises that this solution is suitable for all possible polycations (page 8, lines 6 - 8). D2 describes the activation of the complement system by means of various polycations (including polyethylene) depending on the polycation/DNA charge ratio. In the case of polylysine, this activation is reduced after polyethylene glycolization.

According to the prior art, the problem to be solved by the present application is to provide alternative complexes which are suitable for gene transfer. Having regard to the prior art (D1, D2), the modification of polyethylenimine proposed by the applicants is one of a number of solutions that would occur to a person skilled in the art. Both D1 and D2 describe a positive effect due to polyethylene glycolization. Polyethylenimine is one of the substances used in the prior art. Consequently, the proposed solution is a selection from a number of possibilities which is obvious to a person skilled in the art and which, in order to be inventive, should produce a surprising effect compared with the known solutions. Since the present documents do not, however, appear to contain any information to this effect, an inventive step cannot be acknowledged.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>12/191</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 98/ 03679</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>18/06/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>20/06/1997</b>
Anmelder  <b>BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
  - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
    - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:  
Abb. Nr. — ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
  - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
  - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/87 C07K14/485 C07K14/79 C12N9/12 C07K14/52  
A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KIRCHEIS, R. ET AL.: "Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery." GENE THERAPY, Bd. 4, 1997, Seiten 409-18, XP002081698 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-34
Y	PLANK C ET AL: "ACTIVATION OF THE COMPLEMENT SYSTEM BY SYNTHETIC DNA COMPLEXES: A POTENTIAL BARRIER FOR INTRAVENOUS GENE DELIVERY" HUMAN GENE THERAPY, Bd. 7, Nr. 12, 1. August 1996, Seiten 1437-1446, XP000619665 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/--	1-34

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Oktober 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/11/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 21036 A (VIAGENE INC) 11. Juli 1996 siehe das ganze Dokument, insbesondere die Ansprüche 1,2, und 6, Seite 7 - Zeile 29-30, Seite 27 - Zeile 34-36, Seite 28 - Zeile 13-14, und Beispiel 4. ---	1-34
A	FR 2 362 156 A (PHARMACIA AB) 17. März 1978 siehe das ganze Dokument, insbesondere die Ansprüche 1-3 ---	8
A	WO 95 28494 A (TARGETED GENETICS CORP ;OVERELL ROBERT W (US); WEISSER KAREN E (US) 26. Oktober 1995 siehe das ganze Dokument -----	18

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/03679

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9621036 A	11-07-1996	AU 4690596 A	24-07-1996
FR 2362156 A	17-03-1978	GB 1578348 A	05-11-1980
		AT 359637 B	25-11-1980
		AT 592477 A	15-04-1980
		AU 520366 B	28-01-1982
		AU 2794277 A	22-02-1979
		BE 857869 A	17-02-1978
		CA 1091153 A	09-12-1980
		CH 641681 A	15-03-1984
		DE 2736223 A	23-02-1978
		DK 364277 A,B,	18-02-1978
		JP 1016812 B	27-03-1989
		JP 1537301 C	21-12-1989
		JP 53024033 A	06-03-1978
		NL 7709025 A	21-02-1978
		SE 448147 B	26-01-1987
		SE 7709233 A	18-02-1978
		US 4261973 A	14-04-1981
WO 9528494 A	26-10-1995	AU 2387295 A	10-11-1995
		CA 2187818 A	26-10-1995
		EP 0753069 A	15-01-1997
		JP 10501963 T	24-02-1998

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**